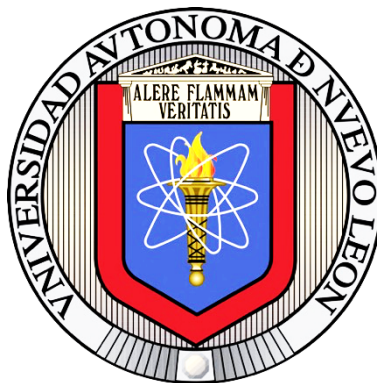


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE LA TERAPIA BASADA EN DOXORRUBICINA/CICLOFOSFAMIDA  
MÁS IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN  
MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

**POR**

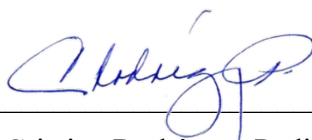
**SILVIA ELENA SANTANA KRÍMSKAYA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología**

**2021**

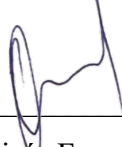
EFFECTO DE LA TERAPIA BASADA EN DOXORRUBICINA/CICLOFOSFAMIDA  
MÁS IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN  
MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

**Comité de Tesis**



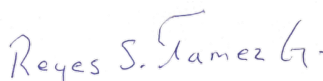
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Presidente



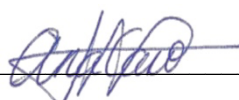
Dr. Moisés Franco Molina

Secretario



Dr. Reyes Tamez Guerra

Vocal



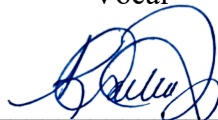
Dra. Ana Carolina Martínez Tórrez

Vocal



Dra. Diana Caballero Hernández

Vocal



Dra. Katuska Arévalo Niño

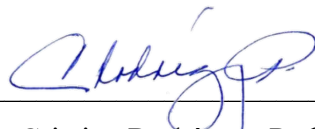
Sub-director de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

EFFECTO DE LA TERAPIA BASADA EN DOXORRUBICINA/CICLOFOSFAMIDA  
MÁS IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN  
MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

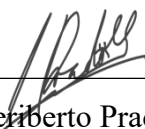
**Dirección de Tesis**



---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Director



---

Dr. Heriberto Prado García

Asesor externo

## **I. Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) le agradezco la beca recibida durante el doctorado, así como múltiples apoyos recibidos por el laboratorio para la formación de maestros y doctores durante la investigación en el transcurso de estos 4 años.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología por permitirme usar las instalaciones y la valiosa instrucción y colaboración de todos sus miembros.

A la doctora Cristina Rodríguez Padilla por aceptarme como su tesista así como por sus valiosos aportes durante el doctorado y desde ya hace varios años atrás. Al Dr. Moisés Franco, amigo y maestro, por formarme como investigadora y hacerme crecer como persona. Al Dr. Tamez Guerra, la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, la Dra. Diana Caballero y el Dr. Heriberto Prado, les agradezco las sugerencias y consideraciones durante el desarrollo de la investigación.

A mis compañeros pasados y presentes del L6, Erika, Carmen, Yareellys, Alex, Paola, Mario, Gustavo, Cristhian, y del L18, Sara, Raúl y Teo, por su amistad, apoyo y por contribuir con esta tesis.



## **I. Dedicatoria**

A mi familia, mis logros se los debo a ustedes.

# ÍNDICE

I.	AGRADECIMIENTOS .....	III
II.	DEDICATORIA .....	IV
I.	ÍNDICE DE TABLAS.....	III
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
III.	LISTA DE SÍMBOLOS Y DE ABREVIATURAS.....	V
IV.	RESUMEN .....	VI
V.	ABSTRACT .....	VII
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Cáncer de mama.....</i>	<i>3</i>
2.2	<i>Microambiente del tumor.....</i>	<i>10</i>
2.3	<i>Inmunoterapia .....</i>	<i>17</i>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
5.1	<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>22</i>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
6.1	<i>Línea celular .....</i>	<i>23</i>
6.2	<i>Animales.....</i>	<i>23</i>
6.3	<i>Reactivos .....</i>	<i>23</i>
6.4	<i>Inducción de la bolsa de aire, inoculación de células 4T1 y tratamientos con animales.....</i>	<i>23</i>
6.5	<i>Inmunohistoquímica.....</i>	<i>25</i>
6.5	<i>Aislamiento de esplenocitos.....</i>	<i>26</i>
6.6	<i>Cocultivo esplenocitos / células 4T1.....</i>	<i>27</i>
6.7	<i>Determinación de citocinas.....</i>	<i>27</i>
6.8	<i>Aislamiento de leucocitos.....</i>	<i>28</i>
6.9	<i>Determinación del inmunofenotipo leucocitario.....</i>	<i>28</i>
6.10	<i>Tinción con hematoxilina y eosina .....</i>	<i>29</i>
6.10	<i>Análisis de sangre y suero. ....</i>	<i>30</i>
6.11	<i>Análisis estadístico .....</i>	<i>30</i>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
7.1	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el volumen y el peso del tumor e incrementó la supervivencia en ratones con tumor de células 4T1.....</i>	<i>31</i>
7.2	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el índice de Ki67 e incrementó los niveles de caspasa 3 activa intratumorales. ....</i>	<i>32</i>
7.3	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de VEGF y <math>\alpha</math>-SMA. ....</i>	<i>33</i>
7.4	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de PD-L1.....</i>	<i>34</i>
7.5	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de galectina 3. ....</i>	<i>35</i>
7.6	<i>La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP incrementó INF-<math>\gamma</math> en el tejido tumoral.....</i>	<i>36</i>
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>

<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>
<b>12.</b>	<b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>	<b>67</b>

## **i. ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.....	<b>25</b>
<b>Tabla 2</b> Lista de los anticuerpos utilizados para determinar el fenotipo de leucocitos por medio de citometría de flujo. ....	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Perfil hepático de ratones con tumor de células 4T1 tratados con la terapia Dox/ciclo + ICRP.	<b>46</b>
<b>Tabla 4.</b> Biometría hemática completa de ratones con tumor de células 4T1 tratados con la terapia Dox/ciclo + ICRP.....	<b>47</b>

## ii. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Grupos experimentales y esquema de administración de la terapia. ....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Volumen y peso de los tumores y supervivencia de ratones Balb/C. .....	<b>31</b>
<b>Figura 3.</b> Expresión de Ki67 y caspasa-3 activa en tejido tumoral .....	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b> Expresión de VEGF y $\alpha$ -SMA en tejido tumoral .....	<b>33</b>
<b>Figura 5.</b> Expresión de CTLA-4, PD1 y PD-L1 en tejido tumoral.....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Expresión de IDO y galectina 3 en tejido tumoral .....	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b> Niveles de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1 en tejido tumoral.....	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Inmunofenotipo de leucocitos de tejido tumoral.....	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Niveles séricos de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1. ....	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Inmunofenotipo de leucocitos de sangre periférica.....	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto citotóxico <i>ex vivo</i> de los esplenocitos sobre las células 4T1. ....	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b> Micrografías representativas de hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón y cerebro .....	<b>45</b>

### iii. LISTA DE SÍMBOLOS Y DE ABREVIATURAS

Ciclo	Ciclofosfamida
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
Dox	Doxorrubicina
Gal-3	Galectina 3
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
IDO	Indol-amina-2,3-di-oxigenasa
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF- $\gamma$	Interferon gamma
LT	Linfocito T
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides
PD-L1	Ligando 1 del receptor de muerte celular programada 1
PD1	Receptor 1 de muerte programada
LT reg	Linfocitos T reguladores
TME	Microambiente del tumor
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso alfa

#### iv. RESUMEN

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en México y a nivel mundial. El subtipo molecular triple negativo es un tipo de cáncer de mama particularmente agresivo. Tratamientos con el potencial para modificar al microambiente del tumor, solos o en combinación con quimioterapia, han surgido como una alternativa prometedora para mejorar el pronóstico de pacientes con cáncer de mama triple negativo. IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable de leucocitos de bazo de bovino con propiedades inmunomoduladoras. En base a dichas propiedades, planteamos la hipótesis de que el IMMUNEPOTENT CRP puede modificar el microambiente tumoral mejorando el efecto del tratamiento neoadyuvante basado en doxorrubicina/ciclofosfamida en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo. En el presente estudio evaluamos la regresión tumoral, la supervivencia de ratones con tumor, y marcadores de proliferación y muerte, Ki67 y caspasa-3, respectivamente, para determinar la actividad antitumoral. También se analizaron *in situ* los factores pro-angiogénicos VEGF y  $\alpha$ -Sma, la expresión de checkpoints CTLA-4, PD1 y PD-L1, el inmunofenotipo de leucocitos y perfil de citocinas. A nivel sistémico se evaluaron el inmunofenotipo de leucocitos y el perfil de citocinas y la biocompatibilidad de tratamientos por medio de biometría hemática completa, perfil hepático en química sanguínea e histología de los principales órganos (hígado, corazón, bazo, riñones, cerebro y pulmones). Finalmente se determinó el efecto citotóxico *ex vivo* de esplenocitos de ratones que recibieron la terapia sobre células 4T1 de cáncer de mama. Nuestros resultados indican que la terapia basada en doxorrubicina/ciclofosfamida + IMMUNEPOTENT CRP induce regresión tumoral completa correlacionando con infiltración de linfocitos T citotóxicos y un incremento en los niveles de interferón- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el microambiente tumoral. Y que el IMMUNEPOTENT CRP restaura la actividad citotóxica de esplenocitos de ratones que han recibido quimioterapia. Nuestros resultados sugieren que el IMMUNEPOTENT CRP puede ser empleado como terapia para remodelar el microambiente del tumor e inducir la respuesta inmune antitumoral en el contexto del cáncer de mama triple negativo.

## v. ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequent types of cancer in Mexico and worldwide. The triple negative molecular subtype is a particularly aggressive type of breast cancer. Treatments with the potential to modify the tumor microenvironment, alone or in combination with chemotherapy, have emerged as a promising alternative to improve the prognosis of patients with triple negative breast cancer.

IMMUNEPOTENT CRP is a dialyzable extract from bovine spleen leukocytes with immunomodulatory properties. For more than ten years, our research group has studied and reported the anti-tumor, antioxidant and anti-inflammatory properties of IMMUNEPOTENT CRP.

Based on these properties, we hypothesized that IMMUNEPOTENT CRP can modify the tumor microenvironment by enhancing the effect of neoadjuvant treatment based on doxorubicin/cyclophosphamide in a murine model of triple negative breast cancer.

In the present study, we evaluated tumor regression, tumor-bearing mice survival, tumor proliferation and death markers Ki67 and caspase-3, respectively, to determine antitumor activity. The pro-angiogenic factors VEGF and  $\alpha$ -Sma, the expression of CTLA-4, PD1 and PD-L1 checkpoints, the leukocyte immunophenotype and cytokine profile were also analyzed *in situ*. At the systemic level, the immunophenotype of leukocytes and the cytokine profile and the biocompatibility of treatments were evaluated by means of complete blood count, liver profile in blood chemistry and histology of the main organs (liver, heart, spleen, kidneys, brain and lungs). Finally, the *ex vivo* cytotoxic effect of splenocytes from mice that received therapy on breast cancer 4T1 cells was determined. Our results indicate that doxorubicin/cyclophosphamide + IMMUNEPOTENT CRP-based therapy induces complete tumor regression, correlating with infiltration of cytotoxic T lymphocytes and an increase in interferon- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels in the tumor microenvironment. And that IMMUNEPOTENT CRP restores the cytotoxic activity of splenocytes from mice that have received chemotherapy.

Our results suggest that ICRP can be used as a therapy to remodel the tumor microenvironment and to induce an antitumor immune response in the triple negative breast cancer setting.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo más común en mujeres tanto en México como a nivel mundial (Gómez-Dantés et al. 2016). Anualmente se diagnostican más de 1,000,000 de casos, y mueren aproximadamente 410,000 personas por esta enfermedad (Shoaib y Ahmed 2016). El cáncer de mama triple negativo es un subtipo molecular particularmente agresivo (Harbeck et al. 2019). Pacientes diagnosticados con el subtipo triple negativo en estado avanzado tienen una expectativa de vida de 18 meses (Khosravi-Shahi, Cabezón-Gutiérrez, y Aparicio Salcedo 2019).

El cáncer de mama triple negativo carece de los receptores de estrógeno, progesterona y factor de crecimiento epidermal, por ende, es resistente a la terapia hormonal y el tratamiento sistémico de primera línea es la quimioterapia doxorrubicina/ciclofosfamida (Harbeck et al. 2019) (MD Anderson Cancer Center 2019).

Se denomina microambiente del tumor (TME) al conjunto de componentes del tejido tumoral (Choudhury et al. 2019). Estos componentes incluyen: células malignas, leucocitos, adipocitos, células del estroma (tales como fibroblastos, pericitos y células endoteliales), citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, entre otros (Choudhury et al. 2019; Osipov, Murphy, y Zheng 2019) La interacción de las células tumorales con su microambiente puede resultar en la eliminación del tumor, la latencia de la enfermedad o la progresión a metástasis (Anari, Ramamurthy, y Zibelman 2018).

El TME es un factor determinante en la respuesta y resistencia a diferentes tratamientos. Por este motivo actualmente se investigan terapias que puedan remodelar al TME, es decir, alterar su composición o inhibir la función de alguno de sus componentes no malignos (Hirata y Sahai 2017). También se estudia el efecto de modificadores del TME con terapias convencionales, como por ejemplo quimioterapias de primera línea (Hirata y Sahai 2017; J.-Y. Li et al. 2021).

El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es un extracto dializable de leucocitos de origen bovino (Coronado-Cerda et al. 2016). Estudios previos han demostrado que el ICRP disminuye el estrés oxidativo en macrófagos murinos por la vía del NF- $\kappa$ B (Moisés A. Franco-Molina et al. 2005), promueve la mielopoyesis en ratones tratados con el agente quimioterapéutico 5 fluorouracilo (Coronado-Cerda et al. 2016), induce muerte inmunogénica en un modelo de melanoma (Rodríguez-Salazar et al. 2017) y previene la implantación del tumor en un modelo de linfoma (Moises A. Franco-Molina et al. 2018).

El propósito de este estudio es determinar si el ICRP actúa como un modificador del microambiente del tumor, potenciando el efecto antitumoral de la quimioterapia de primera línea doxorubicina/ciclofosfamida en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **1.1 Cáncer de mama**

El lóbulo o unidad ductal-lobular terminal (TDLU), es la estructura funcional de la glándula mamaria. La glándula mamaria contiene entre 15 a 20 lóbulos. Uno de los extremos de cada lóbulo se subdivide en alveolos (unidades productoras de leche), el extremo opuesto conecta con un ducto, el cual converge con los demás ductos y son los encargados de llevar la leche desde el lóbulo hasta el pezón (Coleman y Tsongalis 2002).

El cáncer de mama o carcinoma mamario se origina en las células epiteliales que recubren los ductos (carcinoma ductal) o los lóbulos (carcinoma lobular) (Coleman y Tsongalis 2002). El pronóstico de los pacientes con cáncer de mama depende en gran medida de la etapa de la enfermedad. Durante la etapa temprana, es decir, cuando el tumor se encuentra confinado en la luz de los ductos o de los lóbulos glandulares, es curable en un 70-80% de los casos. Sin embargo, en etapas avanzadas, cuando hay infiltración del tumor hacia otros tejidos, se estima una probabilidad de sobrevivencia del 15% (Flores-Luna et al. 2008).

#### **1.1.1 Etiología**

El desarrollo durante la pubertad, el ciclo menstrual y el embarazo son procesos regulados por la fluctuación de los niveles de hormonas, principalmente estrógeno y progesterona (Thiyagarajan, Basit, y Jeanmonod 2020). Estas hormonas estimulan la proliferación celular, incrementando el riesgo de errores en el proceso de reparación del DNA, los cuales inducen mutaciones (Kitagishi, Kobayashi, y Matsuda 2013).

Aunado a esto, el 10% de los casos de cáncer se deben a predisposición genética heredada. Mutaciones en los genes BRCA1 (17q21) y BRCA2 (13q13) están asociadas con un riesgo del 72 y 69 %, respectivamente, para el desarrollo de cáncer de mama. BRCA1 y BRCA2 son genes que codifican para proteínas involucradas en la reparación de extremos homólogos del DNA; y mutaciones en estos genes son de carácter autosómico dominante.

También se han asociado síndromes, como el síndrome de Li Fraumeni y la ataxia telangiectasia, a la predisposición genética a cáncer de mama (Harbeck et al. 2019).

Se estima que el 20% de casos de cáncer de mama están asociados a factores externos, tales como el consumo de alcohol, la obesidad, el uso de anticonceptivos, la inactividad física, tener el primer embarazo después de los 30 años. Se considera que estos factores incrementan el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, sin embargo, la causa determinante en la mayoría de los casos se desconoce, y probablemente se deba a la suma de factores tanto genéticos como ambientales (Harbeck et al. 2019).

Los principales genes mutados en pacientes con cáncer de mama son: TP53 (41%), PIK3CA (30%), MYC (20%), PTEN (16%), CCND1 (16%) ERBB2 (13%), FGFR1 (11%) y GATA3 (10%). Estos genes codifican proteínas que regulan el ciclo celular, inducen proliferación o inhiben apoptosis (Nik-Zainal et al. 2016). El mecanismo exacto por el que se desarrolla cáncer de mama se desconoce, sin embargo, existen dos teorías o modelos. El modelo de la evolución clonal sostiene que las células acumulan mutaciones y cambios epigenéticos, y prolifera la clona más apta. De acuerdo con el segundo modelo, existen células precursoras, llamadas células madres de cáncer, que inician y mantienen la progresión tumoral (Harbeck et al. 2019).

En hombres el desarrollo de cáncer de mama se asocia con mutaciones en el gen BRCA2 (presentado en el 4 al 14% de casos), síndrome de Klinefelter (5% de los casos), desbalance en los niveles de estrógeno y progesterona, cirrosis hepática, cáncer de próstata, edad avanzada (la mayoría de los casos se presentan después de los 60 años), obesidad y hábito de fumar (Cardoso et al. 2018). También se encuentran en riesgo pacientes con reasignación de sexo de masculino a femenino, debido al tratamiento con estrógenos (Stone, Hartley, y Temple-Oberle 2018).

### **1.1.2 Epidemiología**

La incidencia global del cáncer de mama fue de 2.1 millones de casos y 626,679 de defunciones en el año 2018 (Bray et al. 2018). Norte América presenta la tasa de

incidencia más alta (92 casos por cada 100,000 habitantes). Sin embargo, países de África Subsahariana y Asia presentan una mayor tasa de defunciones. La proporción de pacientes jóvenes (menores a 35 años) varía entre el 10% (en países desarrollados) hasta un 25% (en países en vías de desarrollo) (Torre et al. 2016; Ginsburg et al. 2017). Mujeres de ascendencia africana, presentan una mayor tasa de cáncer de mama triple negativo, en comparación con otras etnias (Kohler et al. 2015). La proporción de pacientes diagnosticadas en etapa de metástasis varía entre el 5 al 9% (Bray et al. 2018; DeSantis et al. 2016; 2017)

En México el cáncer de mama es la primera causa de muerte debida a neoplasias en mujeres. Se reporta una incidencia de 27,283 casos y 6,884 muertes por año, equivalentes a una incidencia del 24.2% y una mortalidad del 15% (Gómez-Dantés et al. 2016). La prevalencia del subtipo triple negativo es del 23.1 % y la edad promedio de los pacientes al momento del diagnóstico es de 50 años (Lara-Medina et al. 2011). No hay estudios que reporten la incidencia y mortalidad de mujeres mexicanas con TNBC; sin embargo, si se reporta un periodo de sobrevida promedio de 130 meses (Ignacio Tapia-Salas et al. 2016).

El cáncer de mama en hombres corresponde a menos del 1% de todos los casos diagnosticados y representa menos del 0.5% de las muertes por cáncer de mama (Harbeck et al. 2019).

### **1.1.3 Clasificación**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se clasifica en base a diferentes esquemas.

Histología: está definida por la Organización Mundial de la Salud y con base en esta clasificación los 3 tipos más comunes de cáncer de mamas son:

- Carcinoma de ningún tipo en especial (ductal invasivo) – 55% de los casos
- Carcinoma ductal in situ – 13% de los casos
- Carcinoma lobular invasivo – 5% de los casos

El resto de los tumores se clasifican en: carcinoma tubular, carcinoma invasivo cribiforme, carcinoma medular, carcinoma mucino y otros tumores abundantes en mucina, tumores neuroendocrinos, carcinoma papilar invasivo, carcinoma invasivo micropapilar, carcinoma apocrino, carcinoma metaplásico y carcinoma metaplásico mixto epitelial y mesenquimal (Böcker 2002; Ehemann et al. 2009).

Grado: compara entre la apariencia de las células cancerígenas y la apariencia del tejido normal. Las células se describen como bien diferenciadas (grado bajo), moderadamente diferenciadas (grado intermedio) y pobremente diferenciadas (grado alto). Las células pobremente diferenciadas son las de peor pronóstico (Alfonse, Aref, y Salem 2014).

Estadio: se basa en el tamaño del tumor, diseminación y metástasis.

- Estadio 0: es una enfermedad premaligna o con marcadores positivos (a veces llamada CDIS: carcinoma ductal “*in situ*”). La célula se ha transformado recientemente en cancerígena, pero la membrana basal aún permanece intacta.
- Estadio 1: el tumor no supera los 2 cm de tamaño, pero hay compromiso de la membrana basal.
- Estadio 2: el tumor es mayor de 2 cm, pero no más de 5 cm. No hay diseminación a ganglios linfáticos todavía.
- Estadio 3: este estadio se subclasifica en función del volumen de la masa tumoral y afectación de nódulos linfáticos.
- El estadio 4: el tumor presenta metástasis. El tumor secundario con frecuencia se forma en los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro (Alfonse, Aref, y Salem 2014).

Subtipos moleculares: se basa en la expresión histológica de el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2) y el marcador de proliferación Ki67. Las células que tengan alterada la expresión de alguno de estos receptores se les coloca un signo positivo y un signo negativo si no se produce. Aquellos tumores que no expresan ninguno de estos receptores se les denomina basal o triple negativo (Fragomeni, Sciallis, y Jeruss 2018; Harbeck et al. 2019).

Luminal A: se caracteriza por la expresión elevada de ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup> y HER2<sup>-</sup>, usualmente presenta bajo índice de Ki67 y bajas tasas de proliferación, de histología cribiforme tubular o tubular clásica, tiene buen pronóstico (Harbeck et al. 2019).

Luminal B tipo HER2<sup>-</sup>: es ER<sup>+</sup> pero presenta baja expresión de ER<sup>+</sup> y PR<sup>+</sup> en comparación con el luminal A; HER2<sup>-</sup>, alto grado, alto índice de Ki67; histología micropapilar o lobular pelomórfica; es de pronóstico intermedio (Harbeck et al. 2019).

Luminal B tipo HER2<sup>+</sup>: ER<sup>+</sup>, pero presenta baja expresión de ER<sup>+</sup> y PR<sup>+</sup> en comparación con el luminal A; HER2<sup>+</sup>, alto grado, índice alto de Ki67, de histología de tipo no especial (NST) y pleomórfica; responde a terapias dirigidas; es de pronóstico intermedio (Harbeck et al. 2019).

HER2-enriquecido (no luminal): ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>; es de alto grado; índice alto de Ki67; es agresivo, pero responde bien a terapias dirigidas; es de pronóstico intermedio (Harbeck et al. 2019).

Triple-negativo: ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>; es de alto grado, alto índice de Ki67; histología NST o especial (metaplásica, adenoide cístico, tipo medular y secretorio; generalmente es de pobre pronóstico (Harbeck et al. 2019).

El estado de receptor ha convertido en una evaluación crítica de todos los cánceres de mama, ya que determina la idoneidad del uso de tratamientos específicos, por ejemplo, tamoxifeno y trastuzumab. Estos tratamientos son algunos de los tratamientos adyuvantes más eficaces del cáncer de mama (Vega et al. 2014).

#### **1.1.4 Tratamiento**

El esquema de tratamiento de pacientes con cáncer de mama depende de la carga tumoral (Hasan, Büyüктаhtakın, y Elamin 2019) y el subtipo molecular (Allison et al. 2020; List, Alcaraz, y Batra 2020).

La cirugía es el tratamiento primario para el tratamiento (no paliativo) del cáncer de mama. En medida de lo posible, se realiza la cirugía con conservación de seno, no la mastectomía completa. Dependiendo del estado clínico del paciente (tamaño del tumor, factores de riesgo, comorbilidad, etcétera), la cirugía es la primera o segunda etapa del tratamiento. Puede ser precedida o seguida por tratamiento sistémico. En el caso de pacientes con metástasis, la cirugía puede ser una opción, sin embargo, no hay un consenso sobre los beneficios (List, Alcaraz, y Batra 2020).

La radioterapia y las terapias sistémicas (quimioterapia, tratamiento hormonal, terapias dirigidas, o agentes que modifican la densidad ósea), complementan al tratamiento quirúrgico (Harbeck et al. 2019).

La radioterapia en combinación con quimioterapia disminuye el riesgo de recurrencia tumoral. En el IV estadio, se administra la radiación para aliviar los síntomas de metástasis en hueso, cerebro y tejidos blandos, entre otros, debido a que reduce el volumen de tumor, rescatando tejidos adyacentes comprometidos. Una única dosis de 8 Gy es suficiente en la mayoría de los pacientes con metástasis ósea. La radioterapia también tiene el potencial de inducir una respuesta inmune sistémica (Harbeck et al. 2019).

La quimioterapia se recomienda para pacientes con alto riesgo de recurrencia, por ejemplo, aquellos que presentan mutaciones de alto riesgo o más de 4 nódulos linfáticos afectados. En el caso de pacientes diagnosticados con los subtipos triple-negativo o Her2 sobreexpresado, la quimioterapia neoadyuvante es el tratamiento estándar, seguida por cirugía. Si no se logra la reducción tumoral esperada, se modifica o intensifica la quimioterapia (MD Anderson Cancer Center 2019). Los principales regímenes de quimioterapia son:

- AC-T: doxorrubicina y ciclofosfamida, seguidas por paclitaxel.
- AC-TH: doxorrubicina y ciclofosfamida, seguidas por paclitaxel y trastuzumab.
- AC-THP: doxorrubicina y ciclofosfamida, seguidas por paclitaxel, trastuzumab y pertuzumab.



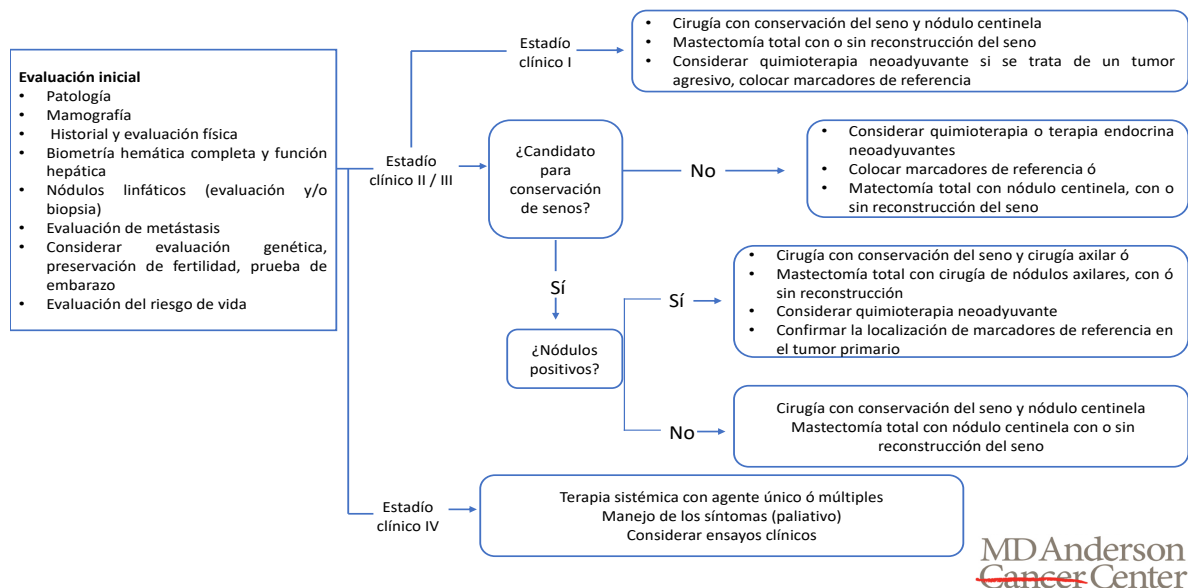
- CMF: ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo.
- TC: docetaxel y ciclofosfamida.
- TCH: docetaxel, carboplatino y trastuzumab.
- TCHP: docetaxel, carboplatino, trastuzumab y pertuzumab.
- TH: paclitaxel y trastuzumab. (MD Anderson Cancer Center 2019)

Los pacientes que presentan receptor de estrógeno positivo reciben terapia endocrina adyuvante. El cáncer de mama ER<sup>+</sup> o PR<sup>+</sup> es dependiente de estrógenos para su crecimiento. Fármacos como el tamoxifen bloquean a estos receptores, y los inhibidores de aromataasa, como el anastrozol, inhiben la producción de estrógenos (Burstein et al. 2014; Ting Bao y Michelle A Rudek 2011).

Anticuerpos monoclonales como Trastozumab, antagonista específico de HER2, han mejorado el período de vida sin recaídas en pacientes con HER2 sobreexpresado, sin embargo, puede ocasionar graves efectos secundarios (Jahanzeb 2008).

Los biofosfonatos (etidronato, alendronato, risedronato) son fármacos que conservan la densidad ósea (Yang y Yu 2020). Estos se administran como terapia adyuvante a mujeres postmenopáusicas o premenopáusicas con terapia de supresión de ovarios (Harbeck et al. 2019).

Existen 4 terapias dirigidas aprobadas por FDA para el tratamiento del TNBC metastásico: los inhibidores de PARP olaparib y talazoparib, para TNBC avanzado con mutación germinal del gen BRCA (Caulfield, Davis, y Byers 2019; Exman, Barroso-Sousa, y Tolaney 2019); el inhibidor de puntos de control del sistema inmune PD-L1, atezolizumab en combinación con nab-paclitaxel (Kang y Syed 2020); el conjugado fármaco-anticuerpo Sacituzumab govitecan-hziy, el anticuerpo Sacituzumab va dirigido contra el receptor 2 del antígeno de superficie de la célula trofoblasto (Trop2) y givotecan es un inhibidor de topoisomerasa (Voelker 2020). Al momento de la escritura de este documento no se han aprobado terapias dirigidas para el tratamiento de primera línea del TNBC.



Algoritmo para el tratamiento del cáncer de mama de acuerdo con las guías del centro del cáncer MD Anderson (actualizado en diciembre del año 2019).

## 1.2 Microambiente del tumor

El concepto del microambiente del tumor surge con los estudios realizados por Stephen Paget en 1889. Paget observó que la distribución de tumores secundarios en pacientes con cáncer de mama no es aleatoria, sino que existe una predilección por ciertos órganos, como el hígado y los huesos, por ejemplo. Paget propone entonces su hipótesis de “la semilla y la tierra”, esta hipótesis establece que las células de cáncer (la semilla) requieren del microambiente permisivo del órgano diana (tierra fértil) para formar un tumor secundario (Paget 1889).

Posteriormente al estudio de Paget, los trabajos de Folkman y colaboradores sobre angiogénesis (Folkman 1974; 1972; Sherwood, Parris, y Folkman 1971) y las conferencias publicadas del congreso en Tel Aviv enfocadas en la caracterización en los componentes del sistema inmune asociados a tumor y su funcionalidad (Hellström y Hellström 1981), fueron algunos de los primeros estudios enfocados en las propiedades del microambiente del tumor (Witz 2009).

El microambiente del tumor (TME) está compuesto por una población heterogénea de células cancerosas, células del sistema inmune infiltrantes y células del estroma (por ejemplo, fibroblastos) (Lei et al. 2020). Las células del sistema inmune asociadas a tumor se clasifican en base a sus propiedades antitumorales o pro-tumorales, como inmunoefectoras o inmunosupresoras, respectivamente (Lei et al. 2020).

### **1.2.1 Células inmunoefectoras**

Los linfocitos T citotóxicos (LT CD8) son considerados una de las principales subpoblaciones de la respuesta inmune antitumoral (Farhood, Najafi, y Mortezaee 2019). Los LT CD8 activados detectan células tumorales por medio de la interacción con péptidos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I). La interacción entre los LT CD8 con células presentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas, induce dicho estado de activación (Gajewski, Schreiber, y Fu 2013).

Los linfocitos T cooperadores (LT CD4) también contribuyen con la activación del LT CD8. Los LT CD4 producen IL-2, estimulando la proliferación de LT CD8; inducen la presentación cruzada de antígenos por parte de células dendríticas, promueven la producción de citocinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras; e inducen la generación de LT CD8 de memoria (Bennett et al. 1997).

Los LT CD8 en su estado activo eliminan células de cáncer por medio de la liberación de perforinas y granzimas, apoptosis inducida por el ligando Fas, y la producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Farhood, Najafi, y Mortezaee 2019). La actividad de los LT CD8 es regulada por *checkpoints* o puntos de control del sistema inmune. Puntos de control del sistema inmune como el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el receptor de muerte programada 1 (PD1) son expresados por los LT CD8 activos. Al entrar en contacto con sus ligandos, CD80 o CD86 y el ligando del receptor de muerte celular programada 1 (PDL-1), el LT CD8 pasa a un estado inactivo (Farhood, Najafi, y Mortezaee 2019).

Las natural killers (NK) comprenden otra subpoblación de células inmunoefectoras. Comparten algunos mecanismos de acción con los LT CD8. Por ejemplo, secretan perforinas y granzimas, inducen apoptosis de células blanco y producen citocinas proinflamatorias (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF, entre otras). Las células NK también promueven la presentación cruzada y forman parte del sistema de inmunovigilancia (Nouroz et al. 2016). Sin embargo, se estima que las células NK asociadas a tumor no son funcionales (Zhang et al. 2018).

Entre las células del sistema inmune innato infiltrantes del tumor destacan las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos. Las células dendríticas presentan antígenos y señales de co-estimulación al LT CD8 (Gajewski, Schreiber, y Fu 2013). Los macrófagos también son células presentadoras de antígenos, sin embargo, su función principal es probablemente la producción citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para la eliminación de células de cáncer (Biswas y Mantovani 2010). Los neutrófilos fagocitan y secretan compuestos citotóxicos (ácido hipocloroso, por ejemplo) y quimiocinas (Y. Li et al. 2019). Cabe mencionar, que las células del sistema inmune innato asociadas a tumor usualmente presentan un fenotipo inmaduro o inmunosupresor (Balkwill, Capasso, y Hagemann 2012; Hotblack et al. 2018).

### **1.2.2 Células inmunosupresoras**

Las células del sistema inmune que promueven el crecimiento tumoral son linfocitos T reguladores (LT reg) y células supresoras derivadas de linaje mieloide (MDSC) (Lindau et al. 2013).

Los T reg se caracterizan por presentar CD4 y expresar el factor de transcripción Foxp3. Bajo condiciones fisiológicas, los LT reg inducen tolerancia inmunológica en células auto-reactivas para mantener la homeostasis (Paluskievicz et al. 2019). Sin embargo, los LT reg asociados a tumor bloquean la activación de LT CD8 y de células NK por medio de: inhibición de la expresión de CD80 y CD86 en células presentadoras de antígenos, expresión del receptor de alta afinidad de IL-2 (CD25) que secuestra IL-2, secreción de

citocinas de supresión y eliminación directa de LT CD8. La expansión clonal de LT reg en tumores sólidos, y su presencia correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Ohue y Nishikawa 2019).

Las MDSC derivan de linaje granulocítico (polimorfonuclear) o monocitoide. Las MDSC de linaje granulocítico son morfológicamente similares a neutrófilos del fenotipo inmunosupresor (N2), y las MDSC de origen monocitoide son morfológicamente similares a macrófagos del fenotipo inmunosupresor (M2) (Lei et al. 2020). El TME se caracteriza por un proceso de inflamación crónica, la cual induce la presencia y proliferación de MDSC. A su vez, las MDSC promueven angiogénesis y metástasis (por medio de la producción de VEGF) y la inactivación de LT CD8, por medio de la depleción de triptófano y la producción de indolamina-2,3 dioxigenasa (IDO) y citocinas inmunosupresoras (TGF- $\beta$  e IL-10, por ejemplo) (Kumar et al. 2016).

### **1.2.3 Células del estroma**

El estroma es la estructura que brinda soporte a los componentes celulares y a la vasculatura (Valkenburg, de Groot, y Pienta 2018). Los fibroblastos asociados a tumor son uno de los principales componentes celulares del estroma (Plava et al. 2019). Algunos autores incluyen también a las células endoteliales y a los pericitos como parte del estroma (Valkenburg, de Groot, y Pienta 2018).

Normalmente, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos en respuesta a señales paracrinas de daño a tejidos. Los miofibroblastos o fibroblastos asociados a tumor (CAF) pueden derivar de células endoteliales (de músculo liso y mioepiteliales) y de células madre mesenquimales. Los CAF secretan factores de crecimiento, los cuales actúan como factores mitógenos sobre células neoplásicas, e inducen transición epitelio-mesenquimal, angiogénesis e inmunosupresión. Se ha reportado que estos efectos son dependientes de la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Balkwill, Capasso, y Hagemann 2012).

Las células endoteliales asociadas a tumor promueven angiogénesis por medio de la producción de factores de crecimiento, de los cuáles el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) es el predominante (Balkwill, Capasso, y Hagemann 2012). La vasculatura del tumor es pobre en estructura y función: se caracteriza por vasos permeables, irregulares, zonas del tejido con poca distribución de oxígeno, nutrientes y fármacos (Niederhuber 2019).

Los pericitos son un componente integral de la vasculatura. La vasculatura del tumor se caracteriza por poseer una baja cantidad de pericitos. Los CAF y pericitos derivados de células mesenquimales y endoteliales se caracterizan por una elevada expresión de la actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA) (Mao et al. 2013).

#### **1.2.4 Modelos para el estudio del TME**

Los tumores son estructuras tridimensionales complejas que interactúan con los tejidos circundantes de forma física y tejidos distantes a través de una compleja red de señales químicas. Los cultivos celulares no se asemejan en estructura ni fisiología al microambiente del tumor y por lo tanto no son adecuados para su estudio (Trujillo-de Santiago et al. 2019).

El tumor en un chip es un dispositivo que simula las condiciones del microambiente del tumor. A escala micrométrica contiene: células tumorales, del estroma y leucocitos, fluidos, canales para que estos circulen simulando así al torrente sanguíneo, una matriz bio-compatibile y parámetros de temperatura y presión ajustables. Este dispositivo es personalizable porque puede contener células y fluidos de la biopsia de un paciente (Trujillo-de Santiago et al. 2019).

La meta del tumor en un chip es crear un modelo artificial del TME que refleje las características reales del tumor, para sustituir o minimizar las pruebas en animales y seres humanos (Wan, Neumann, y LeDuc 2020). Sin embargo, esta tecnología todavía se encuentra en etapa de desarrollo: su fabricación es compleja, hay ambigüedad en los parámetros fisiológicos, no se ha demostrado la relevancia in vivo de los resultados

obtenidos con este dispositivo y los resultados de chips que contienen muestras de pacientes son poco reproducibles (Ahn et al. 2017).

Los modelos en animales son necesarios para estudiar el tumor. Todos los modelos animales presentan ventajas y desventajas, y ninguno se considera un modelo ideal. Generalmente, el estándar de oro es el estudio con células tumorales humanas inoculadas en ratones desnudos. Este modelo, sin embargo, no es una opción para estudiar al TME o inmunoterapias puesto que los ratones desnudos carecen de linfocitos funcionales (Guerin et al. 2020).

De los modelos murinos, el tumor espontáneo es el que más se asemeja al desarrollo tumoral humano. Los tumores espontáneos provienen de ratones genéticamente modificados, por ejemplo, ratones transgénicos con el oncogén PyMT o neu unido al promotor del virus mamario murino (MMTV) desarrollan carcinoma mamario. Estos tumores presentan elementos del TME clínicamente relevantes. La desventaja de estos tumores es que demoran mucho tiempo en desarrollarse y existe elevada variación en el volumen tumoral entre individuos, por lo que no son prácticos para llevar a cabo estudios sistemáticos (Guerin et al. 2020).

El estudio del tumor en ratones singénicos trasplantados con líneas celulares, células de un tumor disgregado, o fragmentos de un tumor es el modelo más común. La principal desventaja de este modelo es que la transición a estudios de fase clínica es difícil (Guerin et al. 2020). El modelo singénico puede ser ortotópico o no-ortotópico. En el modelo ortotópico, las células tumorales son inoculadas en el sitio anatómico del tumor original. La implantación ortotópica es difícil técnicamente, por ejemplo, en cáncer de mama murino, es necesario implantar un número de células similar al del propio tejido (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células) en un área muy pequeña (Zarrouki et al. 2010).

En el modelo no ortotópico el tumor se implanta por lo general en tejido subcutáneo. La implantación del tumor es fácil, reproducible y el volumen tumoral entre individuos es homogéneo. Numerosos autores reportan que el sitio de implantación afecta el crecimiento

del tumor, la vascularización y la resistencia a tratamientos y por ende este modelo tiene poca relevancia clínica (Guerin et al. 2020).

Sin embargo, en el ámbito clínico el tumor no se encuentra restringido en el órgano de origen. Por el contrario, ocurre una reprogramación y alteración del fenotipo para que el tumor pueda hacer metástasis, una de las características distintivas de las células de cáncer. Es decir, que los tumores pueden adaptarse para crecer de forma óptima en tejidos no-ortotópicos (Borgstrom et al. 2013).

En el ámbito preclínico, un estudio se llevó a cabo para determinar la capacidad de adaptación de células tumorales en el microambiente de diferentes tejidos. En dicho estudio, células N202 de tumor mamario se inocularon en un modelo de cámara dorsal con tejido pulmonar. En el primer pase el crecimiento tumoral fue pobre y la vascularización lenta. Para realizar el segundo pase, se aislaron las células tumorales de crecimiento en tejido pulmonar, y se re-implataron en el mismo modelo. En el tercer pase consecutivo el crecimiento tumoral fue robusto y la revascularización rápida (Borgstrom et al. 2013).

El modelo de bolsa de aire es una modificación del modelo descrito por Selye en 1953 (Selye 1953). Consiste en inocular aire en el espacio subcutáneo en la región dorsal posterior del roedor. Es un modelo no ortotópico subcutáneo. Ha sido ampliamente empleado en el estudio del microambiente del tumor, específicamente el efecto de inflamación, el rol del factor de crecimiento vascular-endotelial, entre otros (Appleton et al. 1996). En estudios recientes se empleó este modelo para evaluar el efecto antitumoral del ICRP sobre linfoma (Moises A. Franco-Molina et al. 2018). En experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, observamos que las células 4T1 se implantan con facilidad en este modelo; el tiempo de implantación y volumen tumoral concuerdan con los reportados en la literatura para tumor de células 4T1 implantado en mama.



### **1.3 Inmunoterapia**

En el año 2000, Douglas Douglas Hanahan y Robert Weinberg enunciaron 6 características distintivas del cáncer: mantenimiento de señales de proliferación, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, replicación ilimitada, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg 2000). Con el paso del tiempo, se reconoció la importancia de la interacción entre las células cancerosas y las células del sistema inmune en la progresión tumoral, y la evasión de la respuesta inmune fue incluida como una de las características distintivas del cáncer (Hanahan y Weinberg 2011).

1. La inmunoterapia ha emergido como un importante elemento en el tratamiento del cáncer de mama. Incluye atezolizumab y pembrolizumab, los cuales bloquean al receptor de muerte programada (PD1) y a su ligando; bevacizumab, un inhibidor de angiogénesis; lapatinib, neratinib o tucatinib, agentes que interfieren con las vías de señalización RAS-RAF, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) blanco mecanístico de rapamicina (mTOR); y finalmente, inhibidores de la polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) (Harbeck et al. 2019).

#### **1.3.1 Extracto dializable de leucocitos**

El extracto dializable de leucocitos (EDL) es una fracción de bajo peso molecular (>15 KDa) de origen humano o animal (Castrejón Vázquez et al. 2019). El EDL se prepara con células de donadores sanos y la fracción que se obtiene es inespecífica de antígeno y de especie. Por el contrario, la fracción que se obtiene de individuos inmunizados (previamente sensibilizados), induce inmunidad específica mediada por células (Arnaudov y Kostova 2015). Por este motivo, también se le ha llamado factor de transferencia al EDL específico de antígeno, concretamente a la fracción de 3.5 a 6 KDa (Castrejón Vázquez et al. 2019).

El ascorbato, prostaglandinas, histamina, serotonina, bradiquinina, timosina, nicotinamida, nucleótidos cíclicos, aminoácidos, bases purínicas y factores CySF-L1 y Cys-FL2, son algunos de los componentes activos del EDL. También se han secuenciado péptidos con peso molecular >10KDa (Arnaudov y Kostova 2015). Específicamente la secuencia de aminoácidos LLYAQDL/VEDN, la cual es considerada como el fragmento del factor de transferencia que tiene afinidad por las células blanco (Kirkpatrick 2000).

Se desconoce su mecanismo de acción, sin embargo, las propiedades biológicas del EDL han sido ampliamente reportadas y destacan sus propiedades de restablecimiento y potenciación de la respuesta inmune mediada por células a nivel celular y molecular. En ensayos clínicos, el EDL de origen humano y animal se ha empleado exitosamente para el manejo de enfermedades infecciosas y no infecciosas, incluyendo virus del herpes, tuberculosis y cáncer (Castrejón Vázquez et al. 2019; Arnaudov y Kostova 2015).

### **1.3.2 Extracto dializable de leucocitos bovino (IMMUNEPOTENT CRP)**

El IMMUNEPOTENT CRP es un EDL de origen bovino, específicamente, del bazo (M.A. Franco-Molina et al. 2006). El bazo un órgano linfoide secundario que corresponde al 0.2% del peso corporal, es un órgano encapsulado, que contiene aproximadamente un cuarto de los linfocitos totales, además de macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas y es el sito de almacenamiento del hierro (Cesta 2006).

El IMMUNEPOTENT CRP se obtiene sometiendo al bazo bovino a un proceso de homogenización (mecánica), diálisis ( $\leq 12$  KDa) y finalmente liofilización. Una unidad de IMMUNEPOTENT CRP ha sido definida como el producto final (liofilizado) obtenido a partir  $1 \times 10^8$  células de bazo (Coronado-Cerda et al. 2016).

El ICRP tiene propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antitumorales. Como antioxidante, el ICRP reduce sales de tetrazolio (MTT) *in vitro* (Moises A. Franco-Molina et al. 2018), además en modelos *in vivo* incrementa la actividad del factor de transcripción

Nrf2 en células de médula ósea de ratón (Coronado-Cerda et al. 2016) e inhibe la fosforilación de las fracciones p50 y p60 del Nf- $\kappa$ B en macrófagos humanos (Moisés A. Franco-Molina 2011) y murinos estimulados con LPS (Moisés A. Franco-Molina et al. 2005).

En el ámbito clínico, el ICRP reduce la inflamación en pacientes quirúrgicos (extracción del tercer molar) (Moises A. Franco-Molina et al. 2017), e incrementa los porcentajes de células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y células NK en pacientes con cáncer de mama (Lara et al. 2010) y de pulmón que reciben quimioterapia (M.A. Franco-Molina et al. 2008).

Finalmente, entre sus propiedades antitumorales, el ICRP induce la diferenciación de blastos en la línea celular K562 hacia un fenotipo de monocitos y macrófagos M2 (Sierra-Rivera et al. 2016), induce muerte inmunogénica en el modelo de melanoma murino B16f10 (Rodríguez-Salazar et al. 2017), y reduce el volumen tumoral en modelos de linfoma (Moises A. Franco-Molina et al. 2018) y melanoma (Moisés A. Franco-Molina et al. 2010).

Debido a la heterogeneidad del tumor, los compuestos que afecten múltiples mecanismos simultáneamente tienen mayor probabilidad de tener relevancia clínica (Casey et al. 2015). El ICRP es un extracto con un amplio espectro de actividad y baja toxicidad, sugiriendo que puede ser utilizado en combinación con otras terapias, y potencialmente actuar como modulador del microambiente del tumor para reactivar la respuesta inmune.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama triple negativo constituye un problema de salud pública para el cual no se cuenta con terapias específicas como tratamiento de primera línea. Particularmente en la población de mexicana, la prevalencia del TNBC es mayor que el promedio mundial (23% en comparación con el 15%, respectivamente).

Tratamientos con el potencial para modificar al microambiente del tumor han surgido como una alternativa prometedora para mejorar el pronóstico de pacientes con este tipo de cáncer.

El presente estudio se justifica porque si el ICRP modifica al TME en un modelo preclínico, se daría la pauta para estudiar su uso como un modificador del TME para incrementar la efectividad de quimioterapias en pacientes.

## 4. HIPÓTESIS

La terapia basada en Doxorrubicina/Ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP remodela al microambiente tumoral inhibiendo el crecimiento tumoral y mejorando parámetros de la respuesta inmune *in situ* y periférica en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar si la terapia basada en Doxorrubicina/Ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP remodela al microambiente tumoral inhibiendo el crecimiento tumoral y mejorando parámetros de la respuesta inmune *in situ* y periférica en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto de la terapia combinada sobre el volumen y peso tumorales y la supervivencia en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo.
- 2) Evaluar marcadores de fibroblastos asociados a cáncer ( $\alpha$ -SMA) y factores de angiogénesis (VEGF) en tejido tumoral de ratones previamente tratados.
- 3) Evaluar las poblaciones de leucocitos infiltrantes ( $CD8^+$ ,  $CD4^+$ , LT de memoria, efectoras innatas, MDSC y Treg), niveles de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1) y moléculas de supresión (IDO y galectina 3) en tejido tumoral de ratones previamente tratados con la terapia combinada.
- 4) Analizar las poblaciones de leucocitos ( $CD8^+$ ,  $CD4^+$ , LT de memoria, efectoras innatas, MDSC y Treg) y los niveles de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1) en sangre periférica de ratones con tumor previamente tratados.
- 5) Determinar el efecto citotóxico de esplenocitos de ratones con tumor previamente tratados.
- 6) Evaluar parámetros hematológicos (biometría hemática completa y perfil hepático) e histopatológicos de ratones con tumor previamente tratados.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Línea celular**

La línea celular 4T1 de cáncer de mama murino proviene de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia, EE. UU.). Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (10% v / v) en una atmósfera de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.2 Animales**

Los ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Los ratones vivieron bajo condiciones controladas (ciclos de luz / oscuridad de 12 h con agua y comida *ad libitum*). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la norma oficial mexicana de Bienestar Animal NOM-033-SAG / ZOO-2014 y bajo la aprobación del Comité interno de Investigación y Ética de Bienestar Animal (CEIBA) de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

### **6.3 Reactivos**

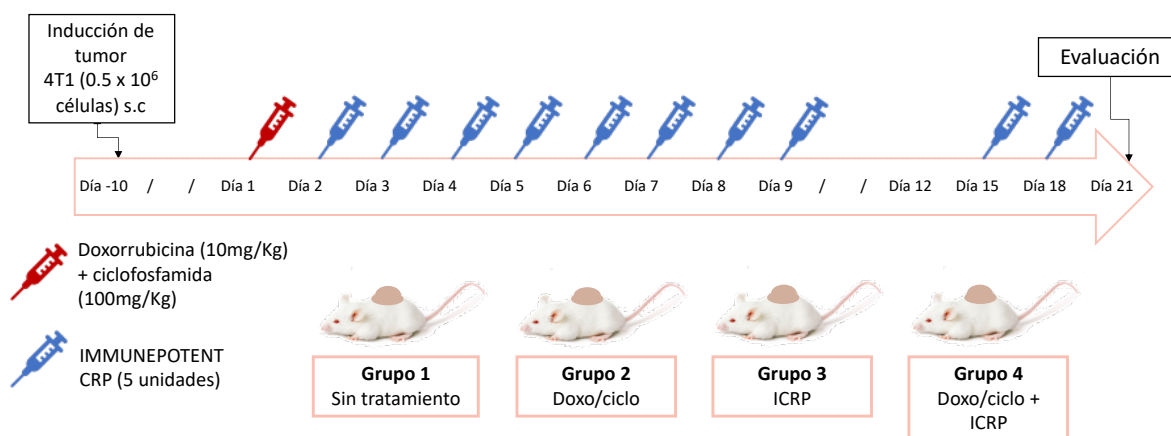
El IMMUNEPOTENT CRP es un extracto de leucocitos bovino dializado (> 12 KDa) libre de endotoxinas. Una unidad de ICRP se ha definido como el producto derivado de  $1 \times 10^8$  células de bazo bovino. La doxorubicina (Doxolem®) se adquirió de Teva Pharmaceuticals (México). La ciclofosfamida (Hidrofosmin®) se adquirió de Sanfer Laboratories (México).

### **6.4 Inducción de la bolsa de aire, inoculación de células 4T1 y tratamientos con animales.**

La técnica de bolsa de aire permite una evaluación más precisa al crear un entorno confinado / definido en el que el fármaco candidato está en contacto directo con el tumor.

Se rasuró la espalda de los ratones y se inyectaron 5 ml de aire estéril por vía subcutánea. Tres días después, se inyectaron 3 ml adicionales de aire estéril para evitar la desinflación.

Posteriormente, se inocularon células 4T1 viables ( $0.5 \times 10^6$ ) dentro de la bolsa de aire. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales ( $n = 5$ ): 1) grupo control: sin tratamiento, 2) grupo Dox/Ciclo (doxorrubicina / ciclofosfamida): una dosis única de Dox (10 mg / kg, vía peritumoral) y Ciclo (100 mg / kg, vía ip), 3) grupo ICRP: 5 unidades de IMMUNEPOTENT CRP diariamente durante 9 días, y 3 administraciones más cada tercer día, por vía s.c peritumoral y 4) Dox/Ciclo + ICRP: los ratones recibirán ambos tratamientos (Dox/Ciclo + ICRP) como se describió anteriormente. El sacrificio se realizó 30 días después de la inoculación de células 4T1 (Figura 1).



**Figura 1. Grupos experimentales y esquema de administración de la terapia.**

El ancho y la longitud del tumor se midieron cada tercer día y el volumen del tumor fue calculado con la fórmula:  $(\text{ancho}^2 \times \text{largo}) / 2$ . Para la determinación del peso, se extrajeron los tumores *post mortem* y se pesaron utilizando una balanza analítica de laboratorio TE241S (Sartorius, Goettingen, Alemania). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo.

Para el experimento de sobrevivencia, cinco ratones adicionales por grupo experimental permanecieron bajo observación durante 60 días después de la inoculación de células 4T1.



Los ratones eran sacrificados si el volumen del tumor alcanzaba los 2000 mm<sup>3</sup>. La supervivencia se graficó en una curva de Kaplan-Meier.

## 6.5 Inmunohistoquímica

Los tumores fueron fijados con formalina (10% en PBS, pH 7.2) durante 24 h, y seguidamente incluidos en parafina.

Se realizaron cortes para obtener secciones de tumor de 3 a 5 µm de grosor sobre un portaobjetos xilanzado, los cuales fueron expuestas a un proceso de desparafinado con calor e hidratación en un gradiente de xilol-alcohol.

Los portaobjetos con cortes de tumor fueron incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en solución salina tamponada con Tris (TBS) durante 5 min y TBS más Triton X-100 al 0.025% por 5 minutos.

Para la recuperación del antígeno, las muestras fueron incubadas con una solución tampón de citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 al 0.05%, pH 6.0) por 30 minutos a 60 °C. Seguido por un proceso de bloqueo con suero normal de caballo Vector Laboratories, California, Estados Unidos. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario respectivo, a 4 ° C durante 24 h. Los anticuerpos utilizados se describen en la tabla 1. Todos los anticuerpos fueron empleados a la dilución 1: 1000.

**Tabla 1** Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Isotipo	Clona	Especificidad	Fuente	Catálogo
CTLA-4	IgG <sub>1</sub> κ	F-8	m, r, h	SCZ	sc-376016
PD1	IgG <sub>1</sub> κ	2B2D1	m, r, h	BD Pharmigen™	sc-53955
PD-L1	IgG/Policlonal	-	m, h, mo	USBiological	364568
IDO	IgG <sub>1</sub> κ	H-11	m,r, h	SCZ	sc-137012
Galectina-3	IgG <sub>1</sub> κ	B2C10	m,r, h	SCZ	sc-32790
Ki-67	IgG	8K5	h, m, r	USBiological	381308
Casapasa-3	IgG <sub>1</sub>	EPR21032	m	Abcam	ab214430
VEGFc	IgG <sub>1</sub>	30AT1174.77.260	m, r, h	BD Pharmigen™	130289
SMA	IgG/Policlonal	-	m, r, h, b, ch	USBiological	A0760-31D

Abreviaturas: IgG, inmunoglobulina G; m (mouse), ratón; r (rat), rata; h (human), humano; mo (monkey), mono; b (bovine), bovino; ch (chicken), gallina; SCZ: Santa Cruz Biotechnology.

Los portaobjetos con cortes de tumor fueron incubados con el anticuerpo secundario universal biotinilado pan-específico de Vector Laboratories (California, Estados Unidos) por 10 minutos, y luego con hematoxilina de Sigma Aldrich (Missouri, Estados Unidos por 30 segundos) como tinción de contraste. Y finalmente se realizó un proceso de deshidratación en un gradiente de alcohol xilol y montaje con Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

Se capturaron micrografías digitales con un microscopio Zeiss Imager.Z1 (Zeiss, Alemania) equipado con una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss, Alemania) y con el software AxioVision V4.6 (Zeiss, Alemania).

La tinción positiva de Diamino-benzidina (DAB) se evidenció por la presencia de células color marrón. La cuantificación de la intensidad de tinción se realizó utilizando el software de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ versión 2.0) con el procedimiento descrito por Patera *et al* (2019).

## **6.5 Aislamiento de esplenocitos**

Los bazos fueron extraídos *post mortem* y colocados en placas Petri bajo condiciones estériles. Los esplenocitos se extrajeron del bazo con PBS estéril (10 ml), brevemente, se inyectó PBS (10 ml) a través de cada bazo, se recolectó la suspensión de células-PBS y este paso se repitió de 7 a 10 veces o hasta que el órgano tornara a una tonalidad pálida.

Posteriormente, la suspensión de células de bazo-PBS se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos.

Para eliminar los eritrocitos, el sedimento se incubó con una solución de lisis de eritrocitos (0.8% de NH<sub>4</sub>Cl, EDTA 0.1 mM, pH 7.2–7.6) en agitación suave durante 5 minutos y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos. Los esplenocitos se resuspendieron en medio de cultivo celular DMEM. La viabilidad celular y el recuento se determinaron mediante la técnica de exclusión de azul de tripano.

## **6.6 Cocultivo esplenocitos / células 4T1**

Células 4T1 viables ( $5 \times 10^4$ ) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a 37°C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 h. Se adicionaron los esplenocitos provenientes de ratones sin tumor o ratones portadores de tumor (no tratados) o tratados con Dox/Ciclo, ICRP o Dox/Ciclo + ICRP en una proporción de células blanco: efectora 1: 1, 1:10 y 1:25 por 24 h a 37 ° C y atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células 4T1 fueron recolectadas con Accutase (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos). La muerte celular de la población 4T1 se analizó con una tinción 7AAD por citometría de flujo empleando el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, California, Estados Unidos), excluyendo a los esplenocitos por tamaño celular y granularidad. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo.

## **6.7 Determinación de citocinas**

Las citocinas se analizaron en tejido tumoral y en sangre periférica al final del experimento (30 días después de la inoculación de células tumorales).

Para la determinación de citocinas en tejido tumoral, los tumores fueron disgregados mecánicamente y e incubados a 4°C con una solución de lisis (cloruro de sodio 150 mM, tritón 100% X al 1%, Tris 50 mM, cóctel inhibidor de proteasa Halt™, pH 8.0) en agitación suave por 60 minutos. Posteriormente, los tumores lisados fueron centrifugados por 20 minutos a 12,000 rpm y el sobrenadante se recolectó y se cuantificó la cantidad de proteínas.

Para la determinación de citocinas en el suero, la sangre periférica se centrifugó a 3600 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R (Hamburgo, Alemania).

Los niveles de citocinas se determinaron con el kit de inflamación del ratón BD Cytometric Bead Array (CBA) (BD Horizon, California, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En resumen, se mezclaron 50 µL del reactivo perlas de captura de Inflamación de Ratón con 50 µL de cada muestra y 50 µL del reactivo detección de PE de Inflamación de Ratón en tubos de ensayo. Los tubos de ensayo fueron incubados por 2 horas bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mililitro de solución de lavado (PBS 1X) a los tubos de ensayo seguido por un paso de centrifugación por 5 minutos a 1200 rpm. Se decantó el sobrenadante y se va a suspendió el sedimento obtenido en 100 µl de solución de lavado (PBS 1X).

Los eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Horizon, California, Estados Unidos). Los niveles de citocinas se analizaron con el software CFlow plus (BD Biosciences, California, Estados Unidos). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo.

## **6.8 Aislamiento de leucocitos**

Los tumores fueron macerados e incubados con 0.1 mg / ml de Liberase™ TL (Roche, Mannheim, Alemania) a 37 °C por 30 minutos en agitación suave. La suspensión celular resultante se suspendió en PBS 1X.

Los leucocitos de esta suspensión de células tumorales o de sangre periférica fueron purificados mediante separación por gradiente de densidad con el reactivo Polymorphoprep™ (Axis Shield, Dundee, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## **6.9 Determinación del inmunofenotipo leucocitario**

Los leucocitos fueron incubados con los anticuerpos acoplados a fluorocromos que se mencionan en la tabla 2.

**Tabla 2** Lista de los anticuerpos utilizados para determinar el fenotipo de leucocitos por medio de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clona	Especificidad	Fuente	Catálogo
CD3	FITC	IgG2b $\kappa$	17A2	m	BD <sup>TM</sup>	55527
CD8	PE	IgG2a $\kappa$	53-6.7	m	BD <sup>TM</sup>	553033
CD4	APC	IgG2a $\kappa$	RM4-5	m	BD <sup>TM</sup>	553051
CD44	PE	IgG2b $\kappa$	IM7	m	BD <sup>TM</sup>	51-9007324
CD62-L	APC	IgG2a $\kappa$	MEL-14	m	BD <sup>TM</sup>	51- 9007326
CD45	PerCP	IgG2b $\kappa$	30-F11	m	BD <sup>TM</sup>	557235
CD71	FITC	IgG1 $\kappa$	C2	m	BD <sup>TM</sup>	553266
CD16/32	APC	IgG2b $\kappa$	2.4G2	m	BD <sup>TM</sup>	558636
CD25	PE	IgG1 $\lambda$	PC61.5	m	eBioscience	12-0251-81
FOXP3	PECy <sup>5</sup>	IgG2a $\kappa$	FJK-16s	b, d, c, m, p, r	eBioscience	15-5773-80A
LY6G/C	PE	IgG2b $\kappa$	RB6-8C5	m	BD <sup>TM</sup>	553128

Abreviaturas: m (mouse), b (bovine), bovino; d (dunkey), burro; c (cat), gato; p (pig), cerdo; r (rat), rata; BD<sup>TM</sup>: BD Pharmingen<sup>TM</sup>

Para la tinción del factor de transcripción FOXP3, las células fueron fijadas con una solución de formaldehído (4% v/v en PBS 1X) por 1 minuto y luego se permeabilizaron con metanol (90% en PBS 1X) por 30 minutos en un baño de agua con hielo, se lavaron dos veces con albúmina (0.5% p/v en PBS 1X) y fueron suspendidas en PBS 1X.

Las células se incubaron con los anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, luego se centrifugaron dos veces con albúmina (0.5% p/v en PBS 1X) por 5 minutos a 1200 rpm y se suspendieron en PBS 1X (100  $\mu$ L).

Los eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD Accuri<sup>TM</sup> C6 (BD Horizon, California, Estados Unidos). Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo.

## 6.10 Tinción con hematoxilina y eosina

Cerebro, pulmones, corazón, hígado y bazo fueron extraídos *post mortem* y fijados con formalina (10% en PBS 1X, pH 7.2) durante 24 h, paso seguido por inclusión en parafina.

Se cortaron secciones de tumor de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de grosor, las cuales fueron desparafinadas con calor e hidratadas en un gradiente de xilol-alcohol.

Los cortes de órganos fueron sumergidos en una solución de hematoxilina Mayer por 8 minutos y posteriormente con una solución de eosina-floxina B por 45 segundos para contrastar, se deshidrataron en un gradiente de xilol-alcohol y se montaron con Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

#### **6.10 Análisis de sangre y suero.**

Después del sacrificio, se recolectó sangre de todos los grupos experimentales en tubos de microtainer con K<sub>2</sub>EDTA para análisis de sangre completa y heparina de litio y gel para análisis del suero.

Los parámetros hematológicos se determinaron en el Hospital de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el analizador Sysmex XS 1000 (Sysmex, Kobe, Japón) y los parámetros bioquímicos con el analizador COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche, Mannheim, Alemania). Los valores de referencia utilizados fueron provistos por el laboratorio.

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco animales por grupo.

#### **6.11 Análisis estadístico**

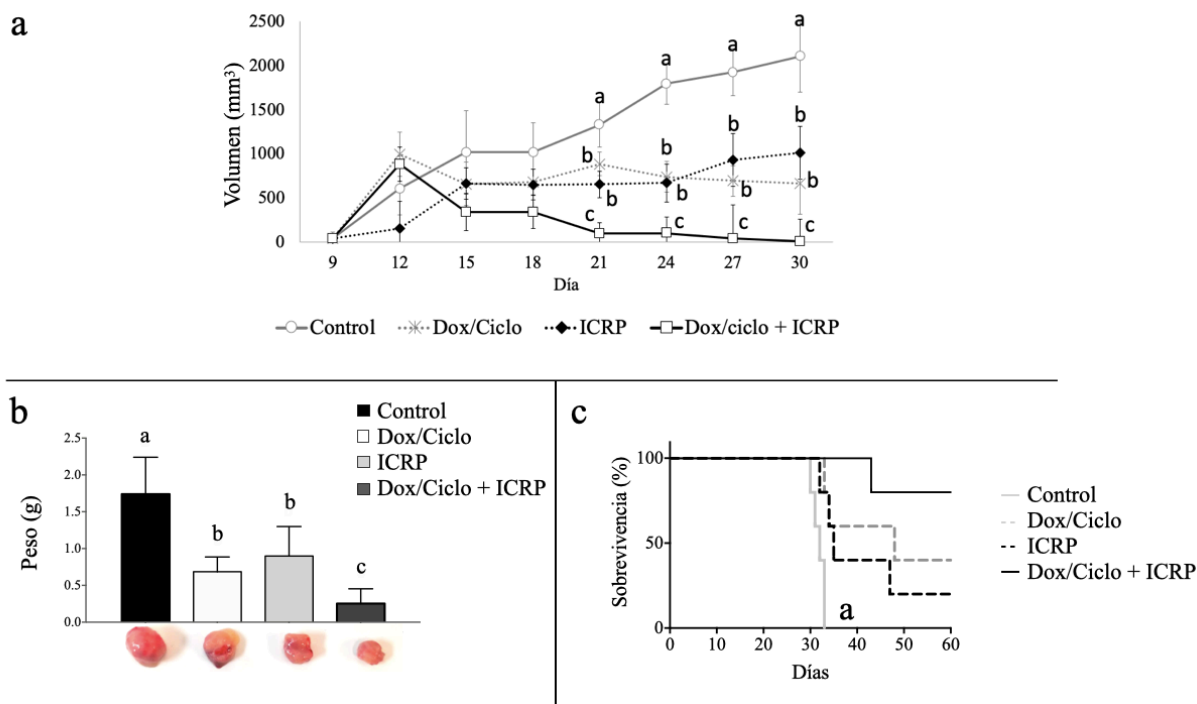
Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron con un ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey o la prueba Mantle-Cox (para el análisis de sobrevivencia). El valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, Estados Unidos).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el volumen y el peso del tumor e incrementó la sobrevivencia en ratones con tumor de células 4T1.

Todos los tratamientos redujeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el volumen y peso del tumor, en comparación con el grupo control (Fig. 2a y b). No hubo diferencia estadística entre los volúmenes y el peso del tumor para los grupos tratados con Dox/ciclo e ICRP. Por otro lado, hubo una disminución significativa en el volumen y el peso del tumor ( $p \leq 0.05$ ) después del tratamiento con Dox/ciclo + ICRP en comparación con los tratamientos restantes (Fig. 2a y b).

No hubo diferencia estadística en la sobrevivencia de ratones de los grupos tratados; por el contrario todos los tratamientos incrementaron la sobrevivencia en comparación con el control (Fig. 2c).

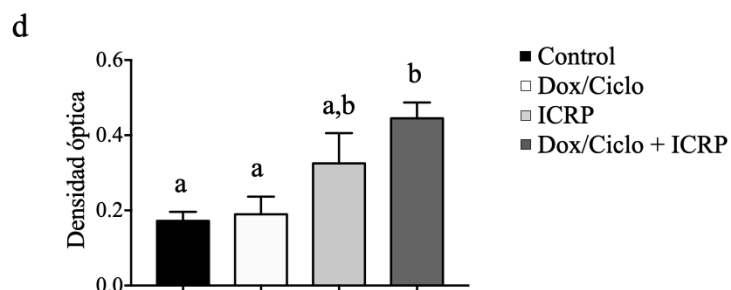
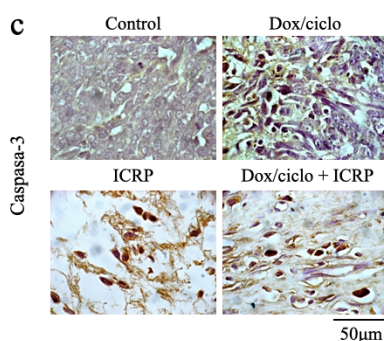
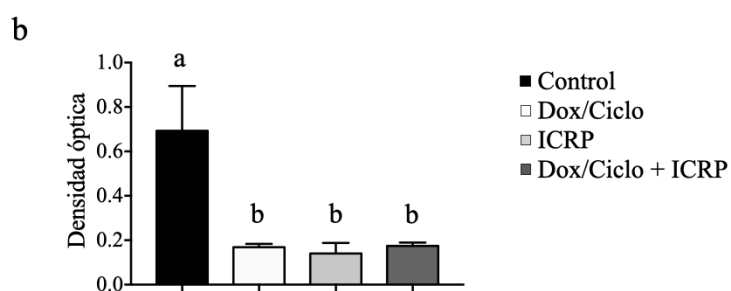
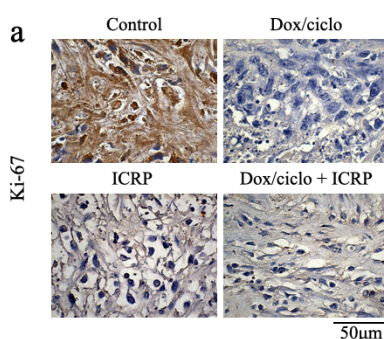


**Figura 2. Volumen y peso de los tumores y sobrevivencia de ratones Balb/C.** El volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) se midió cada tercer día desde el día 9 después de la inoculación (a). Treinta días después de

la inoculación de células 4T1, se sacrificaron 5 ratones de cada grupo experimental, y se midió el peso del tumor (b). Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar por grupo experimental. La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística significativa entre barras marcadas con la misma letra en el gráfico (<sup>a, b, c</sup>). Cinco ratones por grupo se mantuvieron durante 60 días para trazar curvas de supervivencia de Kaplan Meier (c). La diferencia estadística entre los grupos experimentales ( $p \leq 0.01$ ) se determinó con la prueba de log-rank (Mantel-Cox).

## 7.2 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el índice de Ki67 e incrementó los niveles de caspasa 3 activa intratumorales.

Todos los tratamientos disminuyeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de Ki-67 en comparación con el grupo control. No hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la expresión de Ki-67 entre los grupos tratados: Dox/ciclo, ICRP y Dox/ciclo + ICRP (Fig. 3a y b). El tratamiento con Dox/ciclo + ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de caspasa-3 en comparación con los grupos control y Dox/ciclo. No hay diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre la expresión de caspasa-3 de ICRP y los otros grupos (Fig. 3a y b).



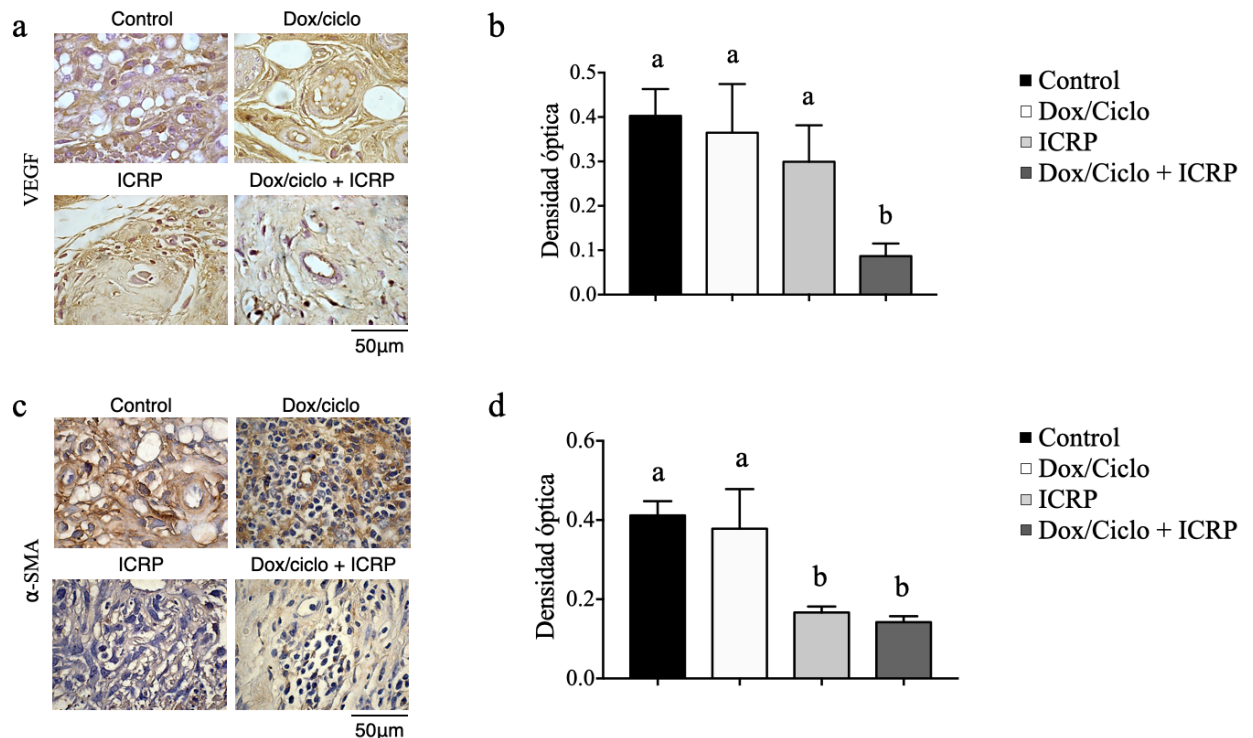


**Figura 3. Expresión de Ki67 y caspasa-3 activa en tejido tumoral.** Inmunohistoquímica de de Ki-67 visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (a) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (b). Inmunohistoquímica representativa de caspasa-3 activa visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (c) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (d). Las barras del gráfico de densidad óptica (b y d) representan la media  $\pm$  DE (n = 5). La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (<sup>a, b</sup>).

### 7.3 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de VEGF y $\alpha$ -SMA.

El tratamiento con Dox/ciclo + ICRP disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de VEGF en comparación con los grupos control, Dox/ciclo e ICRP (Fig. 4a y b).

ICRP y Dox/ciclo + ICRP disminuyeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de  $\alpha$ -SMA en comparación con el control y los grupos Dox/ciclo (Fig. 4c y d).



**Figura 4. Expresión de VEGF y  $\alpha$ -SMA en tejido tumoral.** Inmunohistoquímica de VEGF visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (a) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis

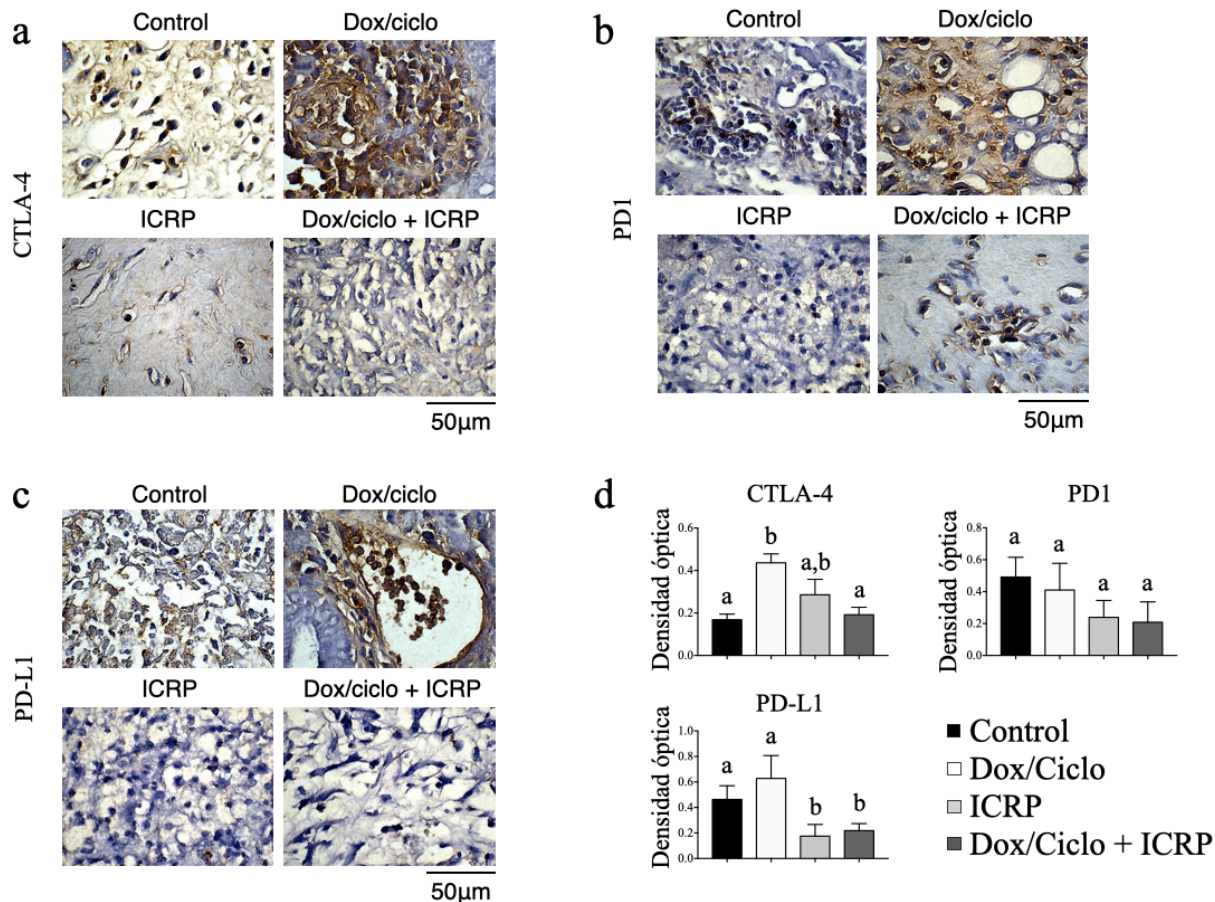
de deconvolución de color (b). Inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (c) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (d). Las barras del gráfico de densidad óptica (b y d) representan la media  $\pm$  DE (n = 5). La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (<sup>a, b</sup>).

#### **7.4 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de PD-L1.**

El tratamiento con Dox/ciclo aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de CTLA-4 en comparación con los grupos control y Dox/ciclo + ICRP. No hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la expresión de CTLA-4 en el grupo ICRP en comparación con los demás (Fig. 5a y d).

No hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la expresión de PD1 entre grupos (Fig. 4b y d).

La expresión de PD-L1 disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en los grupos tratados con ICRP y Dox/ciclo + ICRP en comparación con los grupos control y Dox/ciclo (Fig. 5c y d).



**Figura 5. Expresión de CTLA-4, PD1 y PD-L1 en tejido tumoral.** Inmunohistoquímica de CTLA-4 (a), PD1 (b) y PD-L1 (c) visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina. densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (d). Las barras del gráfico de densidad óptica representan la media  $\pm$  DE (n=5). La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (<sup>a, b</sup>).

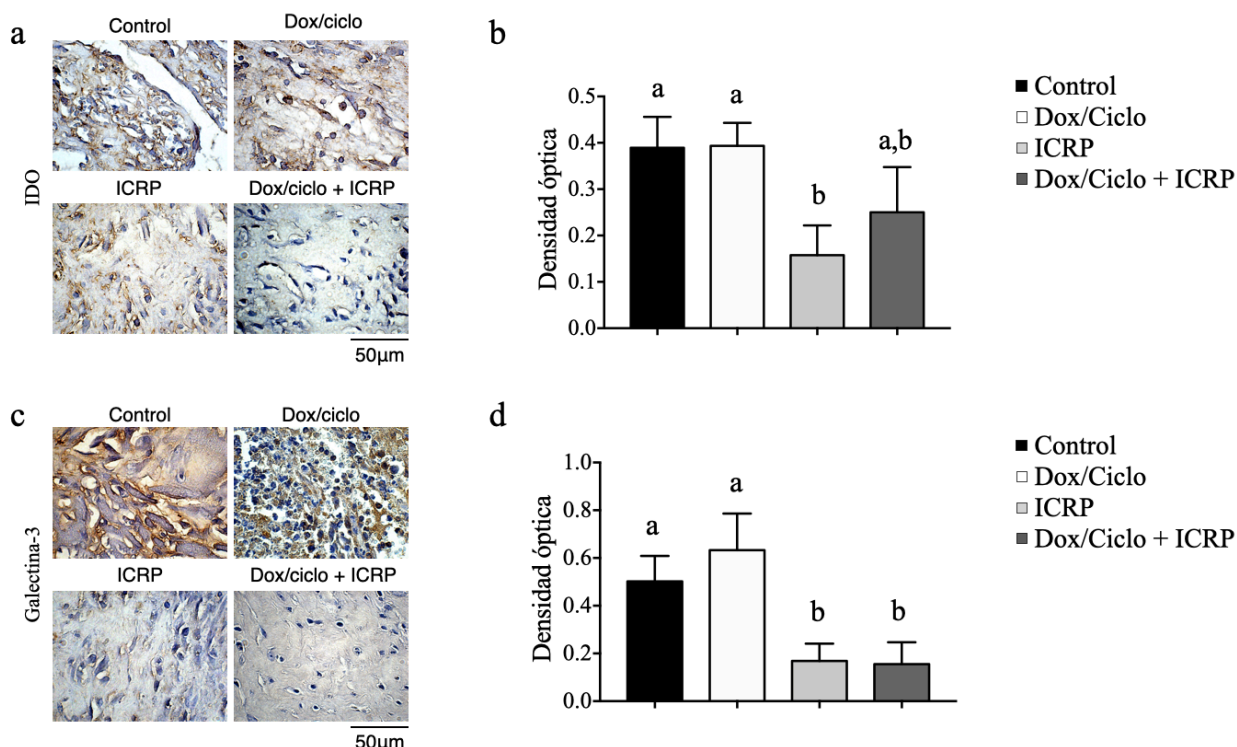
### 7.5 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP disminuyó el nivel intratumoral de galectina 3.

El tratamiento con Dox/ciclo + ICRP disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de Gal-3 (Fig. 6).

El tratamiento con ICRP disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de IDO en el tejido tumoral en comparación con el control y los grupos Dox/ciclo (Fig. 5a y b). No

hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la expresión de IDO en el grupo Dox/ciclo + ICRP en comparación con los otros grupos (Fig. 6a y b).

Los tratamientos con ICRP y Dox/ciclo + ICRP disminuyeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la expresión de Gal-3 en el tumor en comparación con los grupos control y Dox/ciclo (Fig. 6c y d).



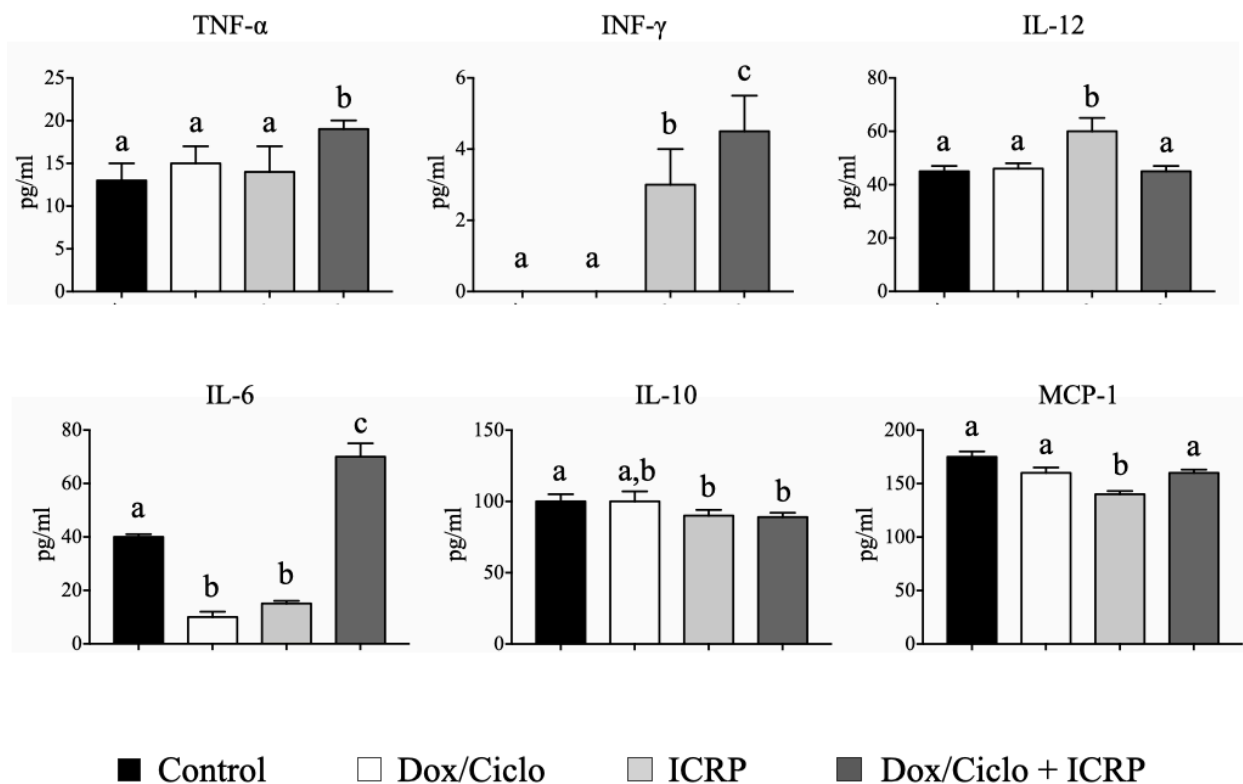
**Figura 6. Expresión de IDO y galectina 3 en tejido tumoral.** Inmunohistoquímica de IDO visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (a) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (b). Inmunohistoquímica de Gal-3 visualizada con DAB y contrastada con hematoxilina (c) y densidad óptica (valor medio de grises) obtenida por análisis de deconvolución de color (d). Las barras del gráfico de densidad óptica (b y d) representan la media  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (<sup>a, b</sup>).

## 7.6 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP incrementó INF- $\gamma$ en el tejido tumoral.

A nivel de microambiente del tumor, Dox/ciclo + ICRP incrementó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-6 y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) IL-10 en comparación con el grupo de control (Fig. 7).

ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) INF- $\gamma$  (2.54 pg / mL) e IL-12 (61.85 pg / mL), y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) IL-6 (15.88 pg / mL), IL-10 ( 86.08 pg / mL) y MCP-1 (139.67 pg / mL), sin afectar TNF- $\alpha$  (14.06 pg / mL), en comparación con el control (Fig. 7).

El tratamiento con Dox/ciclo disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) IL-6 (10.33 pg / mL) en comparación con el control (Fig. 7).



**Figura 7. Niveles de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1 en tejido tumoral.** Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se sacrificaron ratones con tumor de células 4T1 no tratados o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Los tumores fueron lisados con liberasa (Liberase™ TL) y se extrajo el sobrenadante rico en proteínas. El gráfico de barras representa los niveles de citocinas determinados por medio de citometría de flujo con el kit “CBA mouse inflammation kit”. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) ( $n = 5$ ). La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en cada gráfico (a, b, c, d).

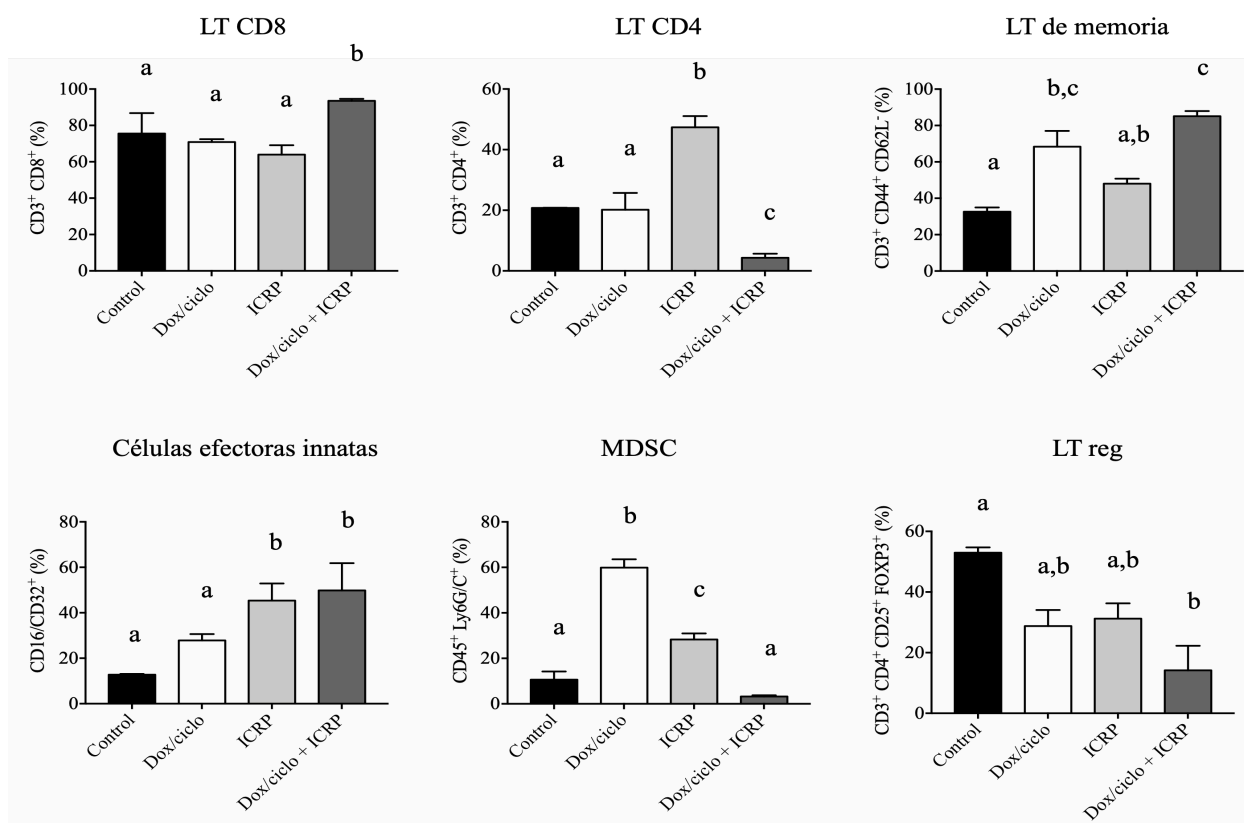
### 7.7 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP aumentó los porcentajes de linfocitos T CD8, linfocitos T de memoria y células efectoras innatas en el tejido tumoral.

Dox/ciclo + ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el porcentaje de células T CD8 (93.5%) en comparación con todos los demás grupos (Fig. 8).

Dox/ciclo + ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el porcentaje de células T de memoria (85.1%) en comparación con el grupo de control (32.65%) y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) las células T reguladoras (14.2%) en comparación con el grupo control (52.95%) (Fig. 8).

ICRP y Dox/ciclo + ICRP aumentaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) las células efectoras innatas (45.35% y 49.8%, respectivamente) en comparación con los grupos control (12.75%) y Dox/ciclo (27.85%). ICRP y Dox/ciclo + ICRP disminuyeron significativamente ( $p \leq 0.05$ )

MDSC (28.3% y 3.2%, respectivamente) en comparación con el grupo Dox/ciclo (59.9%) (Fig. 8).



**Figura 8. Inmunofenotipo de leucocitos de tejido tumoral.** Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se sacrificaron ratones con tumor de células 4T1 no tratados o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Los tumores fueron lisados con liberasa (Liberase<sup>TM</sup> TL) y los leucocitos se aislaron los leucocitos por medio de centrifugación bajo un gradiente de densidades. Los leucocitos fueron incubados con los siguientes cócteles de anticuerpos: LT CD8 (anti-CD3 FITC, anti-CD8 PE); LT CD4 (anti-CD3

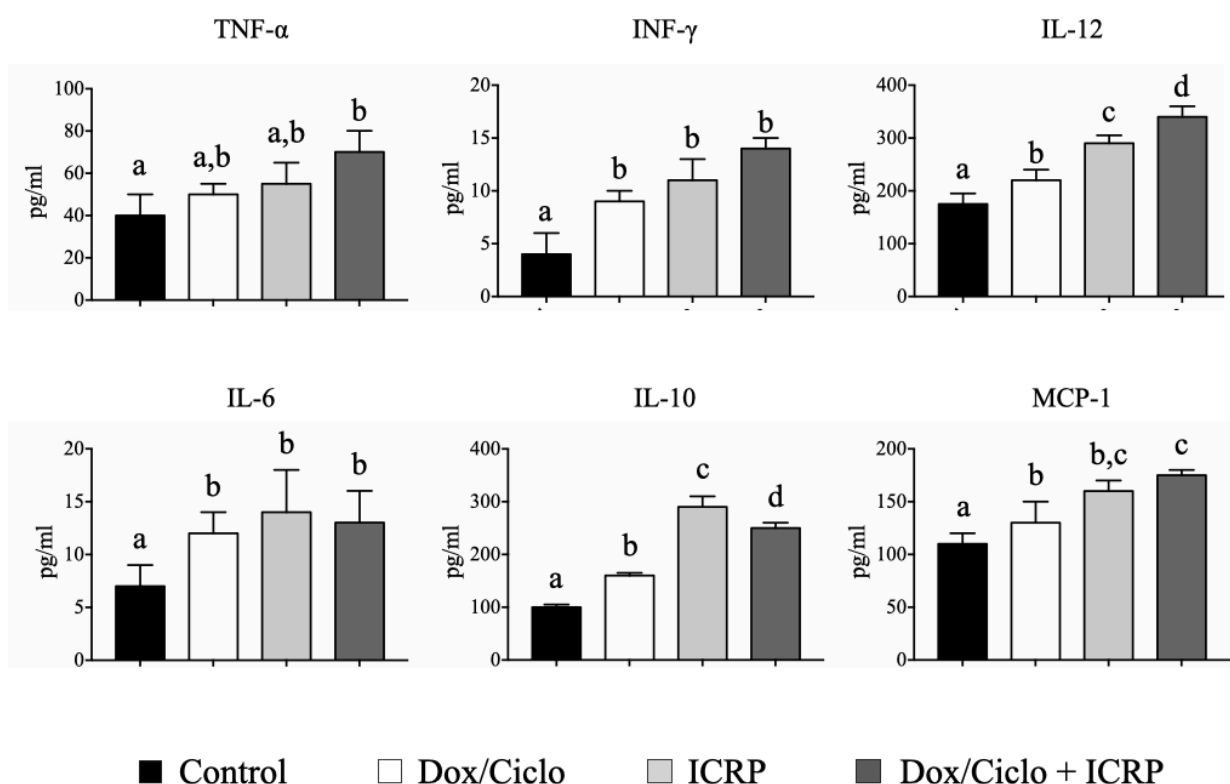


FITC anti-CD4 APC); LT de memoria (anti-CD3FITC, anti-CD44 PE, anti-CD62L APC); células innatas efectoras (anti-CD16/CD32 APC); MDSC (anti-CD45 PerCP, anti-Ly6G/C); LT reg (anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC, anti-CD25 anti-FOXP3 PE-Cy5). El gráfico de barras representa la media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) para cada fenotipo, determinado por medio de citometría de flujo. La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en cada gráfico (<sup>a, b, c</sup>).

### 7.8 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP aumentó los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, MCP-1 e IL-10.

Todos los tratamientos aumentaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) los niveles séricos de INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1 en comparación con el control. Dox/ciclo + ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) TNF- $\alpha$  (70.27 pg/mL) en comparación con el control (41.34 pg/mL).

No hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la expresión de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-6 entre grupos tratados, sin embargo, se encontró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) para IL-12 e IL-10 (Fig. 9)



**Figura 9. Niveles séricos de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP-1.** Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se recolectó suero de ratones con tumor de células 4T1 no tratados (control) o se tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. El gráfico de barras representa los niveles de citocinas determinados por medio de citometría de flujo con el kit “CBA mouse inflammation kit”. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) ( $n = 5$ ). La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (a, b, c, d).

### **7.9 La terapia basada en Dox/Ciclo + ICRP aumentó el porcentaje de linfocitos T CD8 y de memoria y disminuyó los linfocitos T reguladores y células supresoras derivadas de mieloides en circulación sanguínea de ratones con tumor 4T1.**

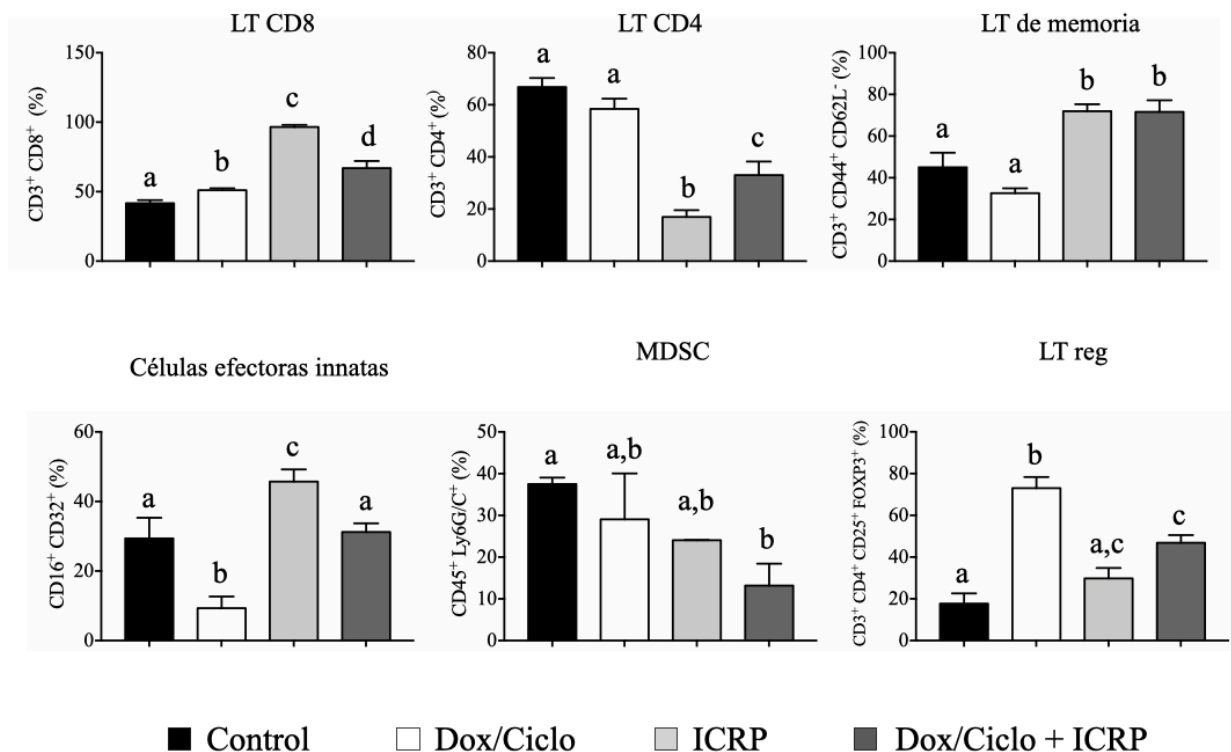
A nivel sanguíneo, Dox/ciclo aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) las células T CD8 (51%) y T reg (73%) y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) las células efectoras innatas (9.35%) sin afectar las células T CD4 (58.4%), linfocitos T de memoria (32.65%) y MDSC (29%) en comparación con el control.

ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) células T CD8 (96.6%), T de memoria (71.95%), células efectoras innatas (45.7%) y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) T CD4 (16.95%) T reg (29.75%) y MDSC (24.05%) en comparación con el control (Fig. 10).

Dox/ciclo + ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) células T CD8 (66.95%), T de memoria (71.65%) y T reg (46.9%) y disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) T CD4 (33.05%), MDSC (13.2 %) sin afectar a las células efectoras innatas (31.2%) en comparación con el control (Fig. 10).

Cuando se comparó entre los grupos tratados, la ICRP, como monoterapia y combinada, aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) células T CD8 (96.6% y 66.95%) y células T de memoria (71.95% y 71.54%) en comparación con el grupo Dox/ciclo (51% y 32,65%, respectivamente). Además, el ICRP, como monoterapia y terapia combinada, disminuyó T reg (29.75% y 46.9%, respectivamente) en comparación con Dox/ciclo (73%) (Fig. 10). El ICRP aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) las células efectoras innatas (45.7%) en comparación con los otros grupos (Fig. 10).





**Figura 10. Inmunofenotipo de leucocitos de sangre periférica.** Se extrajo sangre de ratones con tumor de células 4T1 no tratados o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP 30 días después de la inoculación de células 4T1. Se aislaron los leucocitos por medio de centrifugación bajo un gradiente de densidades. Los leucocitos fueron incubados con los siguientes cócteles de anticuerpos: LT CD8 (anti-CD3 FITC, anti-CD8 PE); LT CD4 (anti-CD3 FITC anti-CD4 APC); LT de memoria (anti-CD3 FITC, anti-CD44 PE, anti-CD62L APC); células innatas efectoras (anti-CD16/CD32 APC); MDSC (anti-CD45 PerCP, anti-Ly6G/C); LT reg (anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC, anti-CD25 anti-FOXP3 PE-Cy5). El gráfico de barras representa la media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) para cada fenotipo, determinado por medio de citometría de flujo. La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (a, b, c, d).

#### 7.10 ICRP restaura parcialmente la actividad citotóxica de esplenocitos en ratones con tumor de células 4T1 tratados con Dox/ciclo.

Se obtuvieron esplenocitos viables de ratones sin tumor y de ratones con tumor de células 4T1 sin tratamiento (control) o tratados con Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Células

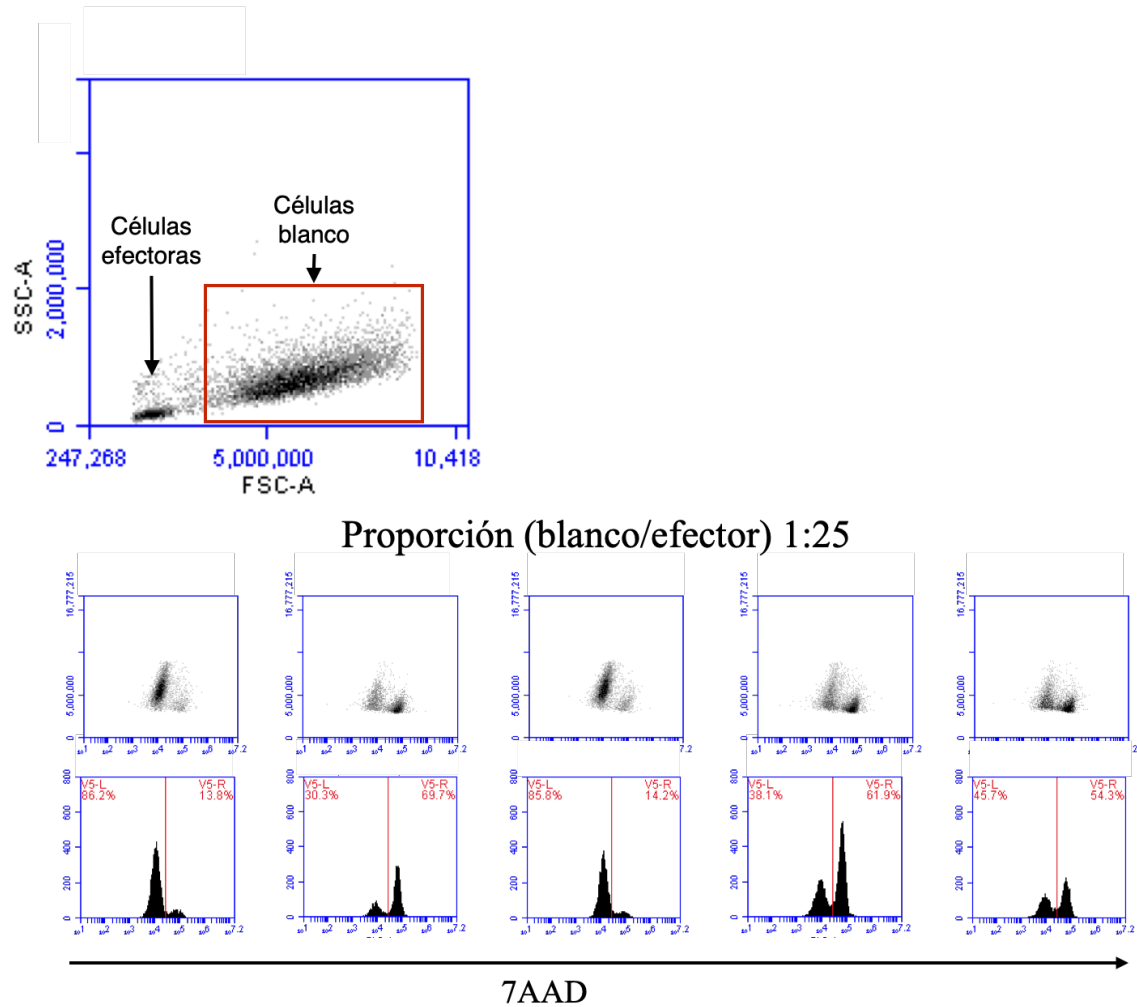
4T1 (células blanco) fueron cultivadas con esplenocitos (células efectoras) en una relación 1: 1, 1:10 y 1:25, blanco : efectora por un lapso de 24 horas (Fig. 11a y b).

En la relación 1: 1, el efecto citotóxico de los esplenocitos sobre las células 4T1 fue del 10% o menos (Fig. 11b).

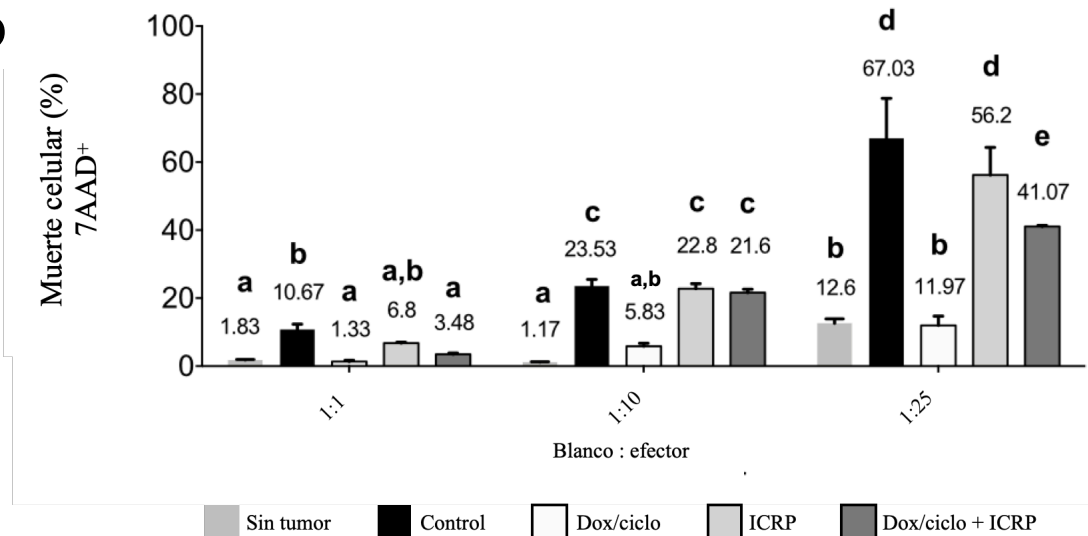
En la relación 1:10, el efecto citotóxico de los esplenocitos fue del 1.17% en ratones sin tumor; 23.53%, en ratones con tumor no tratados; 5.85% en ratones sin tumor tratados con Dox/ciclo; 22.8% en ratones con tumor tratados con ICRP; y 21.6% en ratones con tumor tratados con Dox/ciclo + ICRP. En esta relación el efecto citotóxico de esplenocitos de ratones con tumor sin tratamiento o tratados con ICRP o Dox/ciclo + ICRP fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) que el efecto de los esplenocitos en ratones sin o con tumor tratados con Dox/ciclo (5.83%) (Fig. 11b).

En la proporción 1:25, el efecto citotóxico de los esplenocitos fue del 12.6% en ratones sin tumor; 67.03% en ratones con tumor sin tratamiento, 11.97% en ratones con tumor tratados con Dox/ciclo; 56.2% en ratones con tumor tratados con ICRP; y 41.07% en ratones con tumor tratados con Dox/Ciclo + ICRP. En esta proporción, el efecto citotóxico fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en esplenocitos de ratones con tumor sin tratamiento o tratados con ICRP y Dox/ciclo + ICRP, en comparación con el efecto de esplenocitos de ratones sin tumor o con tumor tratados con Dox/ciclo. El efecto citotóxico de esplenocitos de ratones con tumor sin tratamiento o tratados con ICRP fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con esplenocitos de ratones con tumor tratados con Dox/ciclo + ICRP (Fig. 11a y b).

a



b



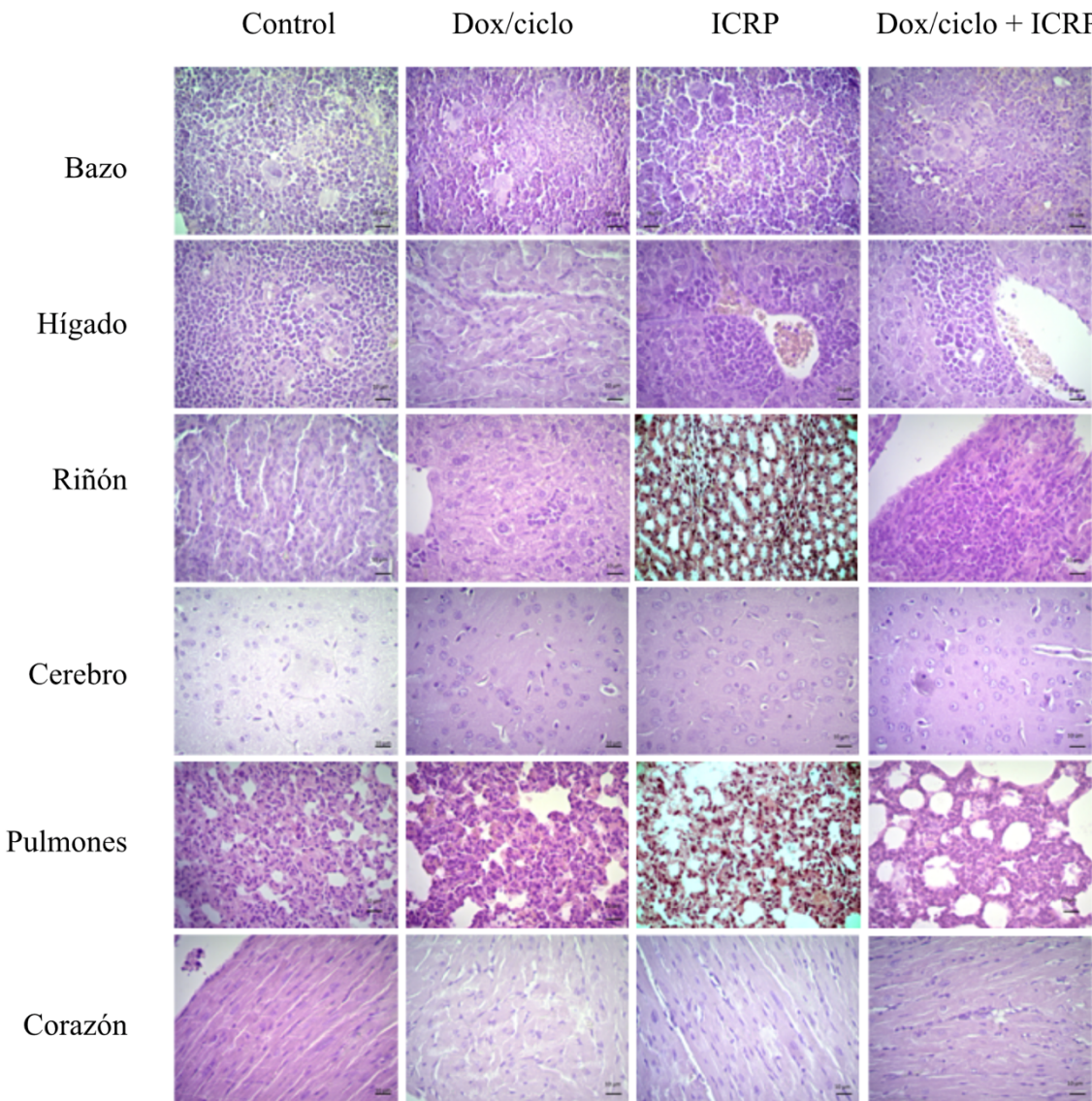
**Figura 11. Efecto citotóxico *ex vivo* de los esplenocitos sobre las células 4T1.** Los esplenocitos de ratones sin tumor y ratones no tratados con tumor de células 4T1 o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP se cultivaron con  $5 \times 10^4$  células 4T1 durante 24 h. (a) Diagrama de densidad de puntos de FSC

(tamaño) y SSC (granularidad) para discriminar esplenocitos (células efectoras) y 4T1 (células objetivo); y diagrama de densidad de puntos FSC con su correspondiente histograma versus 7AAD en la proporción de células blanco : efectora 1:25; gráfico de barras de efecto citotóxico (%) en la proporción de células blanco : efector 1: 1, 1:10 y 1:25 (b). Los valores del gráfico de barras representan la media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) (n = 5). La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre las barras etiquetadas con la misma letra en el gráfico (a, b, c, d).

#### **7.11 ICRP y Dox/ciclo + ICRP no afectaron la histología tisular de bazo, hígado, riñón, cerebro, pulmón y corazón de ratones con tumor de células 4T1.**

La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) no reveló daños notables ni lesiones inflamatorias en los órganos principales (bazo, hígado, riñón, cerebro, pulmón y corazón) para ningún grupo experimental (Fig. 12).

**Figura 12. Micrografías representativas de hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón y cerebro.** Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se sacrificaron ratones con tumor de células 4T1 no tratados o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Se recolectaron: hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón y cerebro. Estos órganos fueron fijados con formaldehído al 10% (v/v) y embebidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos con un grosor de 5  $\mu$ m, y una tinción con hematoxilina y



eosina. Se tomaron fotografías digitales con un lente de aumento del 400X.

### 7.12 ICRP y Dox/ciclo + ICRP mejoraron los parámetros hematológicos y bioquímicos en ratones con tumor de células 4T1.

Los parámetros hematológicos evaluados se encontraban dentro del rango normal, a excepción de una leve leucocitosis ( $15.21 \pm 1.62 \times 10^9 \times L$ ) (Tabla 1) y disminución del hematocrito y la hemoglobina en el grupo control, al ser comparados con los valores de referencia reportados por el laboratorio.

**Tabla 3. Perfil hepático de ratones con tumor de células 4T1 tratados con la terapia Dox/ciclo + ICRP.**

	Control	Dox/ciclo	ICRP	Dox/Ciclo + ICRP	Valor normal
Bilirrubina total (mg/dl)	$0.07 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	$0.085 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.02$	0.00 - 1.40
Bilirrubina directa (mg/dl)	$0.03 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.01$	$0.055 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.02$	0.00 - 0.50
Bilirrubina indirecta (mg/dl)	$0.04 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.00$	$0.03 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.04$	0.00 - 0.90
Proteína total (g/dl)	$5.15 \pm 0.07$	$5.25 \pm 0.21$	$5.05 \pm 0.07$	$5.10 \pm 0.14$	6.0 - 8.1
Albumina (g/dl)	$3.6 \pm 0.01$	$3.65 \pm 0.07$	$3.65 \pm 0.01$	$3.65 \pm 0.21$	3.0 - 5.2
Globulina (g/dl)	$1.55 \pm 0.07$	$1.6 \pm 0.28$	$1.4 \pm 0.01$	$1.45 \pm 0.07$	1.5 - 3.3
AST (UI/L)	$276.5 \pm 20^a$	$97 \pm 1.41^b$	$152 \pm 59.4^c$	$98 \pm 2.83^b$	4 - 37
ALT (U/L)	$187 \pm 25^a$	$59.5 \pm 0.71^b$	$90.5 \pm 40.31^c$	$56 \pm 8.49^b$	4 - 41
Fosfatasa alcalina (U/l)	$124 \pm 19.8$	$103 \pm 5$	$99 \pm 11.31$	$88 \pm 14.84$	40 - 129

Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se recolectó sangre periférica de ratones con tumor de células 4T1 no tratados o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Los parámetros hematológicos se analizaron con el equipo Sysmex XS 1000. Los valores se presentan como media  $\pm$  DE ( $p \leq 0.05$ ) ( $n = 5$ ). La significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre los datos etiquetados con la misma letra (<sup>a, b, c</sup>) en la tabla. AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa. Los valores normales fueron provistos por el Laboratorio de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los parámetros bioquímicos evaluados se encontraron dentro del rango normal, excepto por las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa. Estas se encontraban elevadas en el suero de ratones con tumor sin tratamiento ( $276.5 \pm 20$  UI/L y  $187 \pm 25$  U/L, respectivamente) y sus niveles se restauraron parcialmente en el suero de ratones tratados con Dox/ciclo ( $97 \pm 1.41$  UI/L y  $59.5 \pm 0.71$  U/L, respectivamente), ICRP ( $152 \pm 59.4$  UI/L y  $90.5 \pm 40.31$  U/L, respectivamente) y Dox/ciclo + ICRP ( $98 \pm 2.83$  UI/L y  $56 \pm 8.49$  U/L, respectivamente) grupos (Tabla 2).

**Tabla 4. Biometría hemática completa de ratones con tumor de células 4T1 tratados con la terapia Dox/ciclo + ICRP.**

	<b>Control</b>	<b>Dox/ciclo</b>	<b>ICRP</b>	<b>Dox/ciclo + ICRP</b>	<b>Valor normal</b>
Neutrófilos (%)	39.5 ± 12.02	42.00 ± 16.97	37.50 ± 9.19	44.50 ± 19.09	35.0 - 75.0
Linfocitos (%)	52 ± 8.49	44.50 ± 9.19	52.00 ± 11.31	45.5 ± 7.68	25.0 - 50.0
Monocitos (%)	7.5 ± 3.54	6.5 ± 3.36	7.50 ± 3.54	7.00 ± 0.01	2.0 - 10.0
Eosinófilos (%)	1 ± 0.5	7.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	1.0 - 4.0
Leucocitos totales (10 <sup>9</sup> /l)	15.21 ± 1.62 <sup>a</sup>	6.49 ± 0.18 <sup>b</sup>	9.08 ± 4.24 <sup>b</sup>	6.11 ± 3.54 <sup>b</sup>	4.00 - 10.00
Hematócrito (%)	33.95 ± 2.33	40.45 ± 0.49	42.05 ± 3.61	39.15 ± 2.19	40.0 - 54.0
Hemoglobina (g/dl)	10.95 ± 0.92	12.70 ± 0.5	13.10 ± 1.27	12.05 ± 0.64	14.0 - 17.5

Treinta días después de la inoculación de células 4T1, se obtuvo sangre periférica de ratones con tumor de células 4T1 no tratados (control) o tratados con: Dox/ciclo, ICRP o Dox/ciclo + ICRP. Los parámetros bioquímicos se analizaron con el equipo COBAS INTEGRA® 400 plus. Los valores se presentan como media ± DE ( $p \leq 0.05$ ) ( $n = 5$ ). La significancia estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey. No hay diferencia estadística entre los datos etiquetados con la misma letra (<sup>a,b</sup>). Los valores normales fueron provistos por el Laboratorio de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## 8. DISCUSIÓN

Las terapias del cáncer se basan en un modelo que integra múltiples modalidades de tratamiento de forma racional para lograr el control de la enfermedad (Emens y Middleton 2015). En el presente estudio se evaluó el efecto de la terapia basada en los agentes quimioterapéuticos doxorubicina y ciclofosfamida (Dox/ciclo) más el inmunomodulador IMMUNEPOTETN CRP (ICRP).

Todos los tratamientos retrasaron el crecimiento del tumor e incrementaron la supervivencia de ratones; sin embargo, la combinación de tratamientos Dox/ciclo + ICRP fue más efectiva que el tratamiento con Dox/ciclo o ICRP como monoterapias. A nivel molecular, todos los tratamientos disminuyeron el marcador de proliferación Ki67, pero sólo la terapia combinada Dox/ciclo + ICRP incrementó los niveles de caspasa 3 activa, un marcador de apoptosis.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Nowak et al. (2003) (Nowak, Robinson, y Lake 2003), quienes afirman que la combinación quimioterapias (incluidas doxorubicina y ciclofosfamida) con inmunoterapias tiene el potencial para inducir la regresión completa de un tumor establecido.

A nivel del microambiente del tumor, hubo una disminución de VEGF y  $\alpha$ -SMA, ambos factores asociados a fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), pero que también pueden ser secretados y detectados en su forma soluble (Wang et al. 2019). Tanto VEGF como  $\alpha$ -SMA son considerados importantes blancos terapéuticos en el tumor debido a que los CAFs inducen angiogénesis para poder obtener oxígeno y nutrientes (Bridges y Harris 2015). Este resultado concuerda con un estudio previo de Franco-Molina y colaboradores, quienes reportaron propiedades antiangiogénicas del ICRP en un modelo de melanoma murino (Moisés A. Franco-Molina et al. 2010).

Como parámetros de la respuesta inmune local, se evaluaron los niveles de expresión de los puntos de control del sistema inmune CTLA-4, PD1 y PD-L1, moléculas de supresión IDO y galectina 3, perfil de citocinas y fenotipo de leucocitos infiltrantes de tumor.



Los puntos de control del sistema inmune (CTLA-4, PD1 y PD-L1) y moléculas de supresión (IDO y Gal-3) se encuentran sobre-expresados en el TME, comprometiendo la respuesta inmune mediada por linfocitos T y correlacionando con un pronóstico pobre para los pacientes (Esteva et al. 2019).

CTLA-4 y PD1 son receptores de superficie de células T que bloquean las señales de activación del complejo del receptor de células T (TCR) (Buchbinder y Desai 2016) y pueden encontrarse en la membrana celular de linfocitos T activados y células T reg (Z. Li et al. 2018). Nuestros resultados indican un incremento en los niveles de CTLA-4 en el grupo tratado con quimioterapia. Este resultado correlaciona con un incremento de MDSC, y de acuerdo con Liu y colaboradores (Y. Liu et al. 2009) las MDSC pueden expresar CTLA-4.

PD-L1, Gal-3 e IDO son expresados en células T, células presentadoras de antígenos, cáncer y estroma células (Gruosso et al. 2019; Hwang, Park, y Kwon 2019; White, Roife, y Gomer 2015). PDL-1 es un ligando que interactúa con PD1, inhibiendo la activación del complejo del TCR. Gal-3 es una lectina que bloquea la señalización del TCR de forma directa al unirse a glicanos presentes en su superficie. IDO es una enzima que degrada al triptófano, aminoácido esencial para el metabolismo de LT activos.

El ICRP y la terapia combinada ICRP + Dox/ciclo disminuyeron los niveles de PD-L1 y gal-3, pero no de CTLA-4, PD1 o IDO. Cabe mencionar que el ICRP disminuye los niveles de NF- $\kappa$ B en líneas tumorales de cáncer de mama, y la expresión de este factor de transcripción puede inducir PD-L1 y gal-3 (Antonangeli et al. 2020; Umezawa 2012). Esta podría ser una posible vía para la disminución de la expresión de PD-L1 e gal-3 a nivel del TME.

También evaluamos los niveles intratumorales de algunas de las principales citocinas involucradas en la respuesta inmune antitumoral. Los resultados demuestran un incremento de los niveles intratumorales de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en el grupo tratado con la

terapia combinada, sugiriendo que predomina el perfil de citocinas del tipo Th1. Sin embargo, cabe mencionar que observamos diferencias en la expresión de citocinas en una manera dependiente del tratamiento, especialmente la IL-6.

Los tratamientos Dox/ciclo y el ICRP disminuyeron la IL-6 en el TME con respecto al control. La IL-6 producida por el tumor induce producción de proteínas anti-apoptóticas, inflamación crónica y la inmunosupresión, y en general promueve la progresión tumoral (Beyranvand Nejad et al. 2021). La disminución de IL-6 puede deberse a la disminución del volumen tumoral, y en consecuencia del número de células productoras de esta citocina.

Por el contrario, la terapia combinada Dox/ciclo + ICRP incrementó la IL-6 con respecto al control. Beyranvand y colaboradores demostraron que en terapias antitumorales donde el sistema inmune juega un rol activo, el incremento de IL-6 induce un proceso de inflamación aguda necesario para la activación de linfocitos T efectores y macrófagos M1 (Beyranvand Nejad et al. 2021). En dicho estudio se sugiere que el incremento de IL-6 es producido por macrófagos M1 (Beyranvand Nejad et al. 2021).

El último parámetro inmunológico evaluado *in situ* fue el fenotipo de los leucocitos infiltrantes. Fue notable el incremento de MDSC en el grupo tratado con Dox/ciclo como monoterapia, particularmente porque dosis bajas de ciclofosfamida se emplean para disminuir a los LT reg (Ghiringhelli et al. 2007); sin embargo, en este estudio se empleó la dosis terapéutica (máxima dosis tolerable), y se ha reportado que la combinación Dox/ciclo puede incrementar los niveles de MDSC en pacientes con cáncer (Diaz-Montero et al. 2009; Becker y Schrama 2013).

En el grupo que recibió la terapia combinada, los resultados reflejan un incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos T de memoria y células efectoras de la inmunidad innata; esto concuerda con los resultados del perfil de citocinas y la disminución de PD-L1 y galectina-3, e indican el establecimiento de una respuesta inmune del tipo celular (Murata, Tsukahara, y Torigoe 2016).

Para evaluar a nivel sistémico el estado inmunológico de los ratones incluidos en el estudio, evaluamos los niveles de citocinas y fenotipo de leucocitos a nivel periférico.

En todos los grupos tratados se observó un incremento de INF- $\gamma$ , IL-12 y MCP-1, correlacionando con una respuesta inmune del tipo celular. También hubo incremento en los niveles séricos de IL-6 e IL-10. La IL-10 se clasifica como inmunosupresora debido a que esencialmente inhibe mediadores de inflamación (Qu, Tang, y Hua 2018). Sin embargo, al igual que la IL-6, la IL-10 está involucrada en diferentes procesos, incluidos el correcto funcionamiento de una respuesta mediada por linfocitos T (Trinchieri 2007) y la regeneración de tejidos (King et al. 2014). Por este motivo, la función de ambas citocinas debe inferirse en base al contexto de regresión tumoral.

Correlacionando con este perfil de citocinas, en el grupo tratado con la combinación incrementó la proporción de LT CD8<sup>+</sup> y LT de memoria, disminuyó la población de MDSC en comparación al grupo sin tratamiento y disminuyó la población de LT reg en comparación con el grupo tratado con Dox/ciclo como monoterapia. Los LT CD8<sup>+</sup> son esenciales para el proceso de inmunovigilancia y correlacionan con pronóstico favorable (Roma-Rodrigues et al. 2019). Además, la regresión tumoral, el perfil de citocinas Th1 y el incremento de LT de memoria, parecen indicar que los LT CD8<sup>+</sup> detectados mantienen un fenotipo del tipo efector.

Para corroborar el estado de la respuesta inmune antitumoral realizamos un ensayo de co-cultivo de células 4T1 con esplenocitos. No se encontró diferencia significativa entre la actividad citotóxica de esplenocitos del grupo control y el grupo tratado con ICRP. Por el contrario, los esplenocitos de ratones tratados con Dox/ciclo, no eliminaron a las células 4T1, indicando que hay una deficiencia en la inmunidad antitumoral a nivel, que podría deberse a una falla en el proceso de presentación de antígenos o de activación de linfocitos T, tal vez por el incremento de CTLA-4 y MDSC; sin embargo, la actividad citotóxica de esplenocitos se recuperó significativamente en el grupo que recibió la terapia combinada. Dicha recuperación podría deberse a las propiedades quimioprotección del extracto

reportadas previamente por Coronado-Cerda y colaboradores (Coronado-Cerda et al. 2016).

En general, nuestros resultados indican que el ICRP como terapia complementaria incrementa la efectividad terapéutica de la quimioterapia Dox/ciclo en un modelo murino de cáncer de mama. A continuación se describe un posible mecanismo de acción para este efecto.

La terapia combinada Dox/ciclo + ICRP indujo arresto del ciclo y muerte celular, evidenciado por la disminución de Ki67 e incremento de caspasa 3 activa. Esto ocasionó la disminución del volumen del tumor, el cual es fuente de factores de supresión de la respuesta inmune (Nishio et al. 2014). La disminución de factores de supresión del tumor aunado con las propiedades inmunomoduladoras del ICRP (Franco-Molina et al. 2019) permitieron la remodelación de los componentes no-tumorales del TME. Dicha remodelación incluyó el incremento de LT CD8<sup>+</sup> y LT de memoria, y una disminución de linfocitos T reg y fibroblastos asociados a cáncer.

También incrementaron los niveles de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-6, estas citocinas inducen la activación de células efectoras del sistema inmune innato (macrófagos, células dendríticas y células NK) (Calzascia et al. 2007; Arango Duque y Descoteaux 2014; Frasca et al. 2008; Hervas-Stubbs et al. 2011; Fisher, Appenheimer, y Evans 2014), promoviendo la captación de antígenos tumorales, un paso clave para el establecimiento de una respuesta inmune antitumoral.

Finalmente, se evaluó la biocompatibilidad de la terapia combinada Dox/ciclo + ICRP. Una de las principales limitantes en los tratamientos antitumorales es la elevada toxicidad; sin embargo, en el presente estudio se realizó análisis histopatológico de los principales órganos (cerebro, pulmones, corazón, hígado y bazo), así como parámetros hematológicos y bioquímicos.

El grupo sin tratamiento presentó leucocitosis y anemia leves, ambos factores han sido previamente descritos para ratones con tumor 4T1 (Demečková et al. 2017; Solár et al. 2017; M. Liu et al. 2015).

También se observó un incremento de las enzimas alanina-amino-transferasa y aspartato-amino-transferasa; sin embargo al no haber daño a nivel histológico en hígado, estas alteraciones sugieren un proceso inflamatorio inducido por el tumor, por lo que podemos concluir que la combinación de tratamientos es segura.

## 9. CONCLUSIONES

- La terapia basada en doxorubicina/ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP reduce el volumen tumoral, incrementan caspasa 3 activa y disminuyen el índice de proliferación celular intrautmorales, e incrementan la supervivencia de ratones con tumor de células 4T1.
- La terapia basada en doxorubicina/ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP baja los niveles *in situ* de actina alfa de músculo liso y del factor de crecimiento vascular endotelial.
- La terapia basada en doxorubicina/ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP inhibe las moléculas de supresión (galectina 3, IDO y PD-L1), incrementa el perfil de citocinas del tipo Th1 y linfocitos CD8<sup>+</sup> infiltrantes.
- A nivel periférico, la terapia basada en doxorubicina/ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP induce un perfil de citocinas Th1, incrementando a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y de memoria, y reduce los niveles de linfocitos T reguladores y células derivadas de mieloides.
- El IMMUNEPOTENT CRP restaura parcialmente la actividad citotóxica específica de esplenocitos de ratones tratados con doxorubicina/ciclofosfamida.
- La terapia basada en doxorubicina/ciclofosfamida más IMMUNEPOTENT CRP no induce cambios a nivel histológico en los principales órganos (cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñones y bazo).

## **10. PERSPECTIVAS**

A partir de los resultados presentados en esta tesis deberían realizarse experimentos con ratones inmunodeficientes (células T, células B, asesino natural y macrófagos) para aclarar el papel de la IMMUNEPOTENT CRP como modificador de la respuesta inmune a niveles sistémico e intratumoral. También sería de interés evaluar la eficacia de lograr la regresión del tumor en otros modelos de cáncer de mama.

## 11.BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, Jungho, Yoshitaka Sei, Noo Jeon, y YongTae Kim. 2017. Tumor microenvironment on a chip: the progress and future perspective. *Bioengineering* 4 (4): 64. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030064>.
2. Alfonse, Marco, Mostafa Aref, y Abdel-Badeeh Salem. 2014. An ontology-based system for cancer diseases knowledge management. *International Journal of Information Engineering and Electronic Business* 6 (6): 55–63. <https://doi.org/10.5815/ijieeb.2014.06.07>.
3. Allison, Kimberly H., M. Elizabeth H. Hammond, Mitchell Dowsett, Shannon E. McKernin, Lisa A. Carey, Patrick L. Fitzgibbons, Daniel F. Hayes, et al. 2020. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: american society of clinical oncology/college of american pathologists guideline update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 144 (5): 545–63. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0904-SA>.
4. Anari, Fern, Chethan Ramamurthy, y Matthew Zibelman. 2018. Impact of tumor microenvironment composition on therapeutic responses and clinical outcomes in cancer. *Future Oncology* 14 (14): 1409–21. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0585>.
5. Antonangeli, Fabrizio, Ambra Natalini, Marina Chiara Garassino, Antonio Sica, Angela Santoni, y Francesca Di Rosa. 2020. Regulation of PD-L1 expression by NF-κB in cancer. *Frontiers in Immunology* 11 (11): 584626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584626>.
6. Appleton, Ian, Nicola J. Brown, Dean Willis, Paul R. Colville-Nash, Chandom Alam, Joanne R. Brown, y Derek A. Willoughby. 1996. The role of vascular endothelial growth factor in a murine chronic granulomatous tissue air pouch model of angiogenesis. *The Journal of Pathology* 180 (1): 90–94. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199609\)180:1<90::AID-PATH615>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199609)180:1<90::AID-PATH615>3.0.CO;2-D).
7. Arango Duque, Guillermo, y Albert Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* 5 (10). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.
8. Arnaudov, Atanas, y Zhivka Kostova. 2015. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29 (6): 1017–23. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1060136>.
9. Balkwill, Frances, Melania Capasso, y Thorsten Hagemann. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science* 125 (23): 5591–96. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>.
10. Becker, Jürgen C., y David Schrama. 2013. The dark side of cyclophosphamide: cyclophosphamide-mediated ablation of regulatory T cells. *Journal of Investigative Dermatology* 133 (6): 1462–65. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.67>.
11. Bennett, Sally R.M., Francis R. Carbone, Freda Karamalis, Jacques F.A.P. Miller, y William R. Heath. 1997. Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 186 (1): 65–70. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.65>.



12. Beyranvand Nejad, Elham, Camilla Labrie, Marit J van Elsas, Jan Willem Kleinovink, Hans-Willi Mittrücker, Kees L M C Franken, Sylvia Heink, et al. 2021. IL-6 signaling in macrophages is required for immunotherapy-driven regression of tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 9 (4): e002460. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002460>.
13. Biswas, Subhra K, y Alberto Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11 (10): 889–96. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>.
14. Böcker, W. 2002. WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Fur Pathologie* 86: 116–19.
15. Borgstrom, Per, Phil Oh, Malgorzata Czarny, Brian Racine, y Jan E Schnitzer. 2013. Co-implanting orthotopic tissue creates stroma microenvironment enhancing growth and angiogenesis of multiple tumors. *F1000Research* 2 (agosto): 129. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-129.v2>.
16. Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, y Ahmedin Jemal. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
17. Bridges, Esther, y Adrian L. Harris. 2015. Vascular-promoting therapy reduced tumor growth and progression by improving chemotherapy efficacy. *Cancer Cell* 27 (1): 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.009>.
18. Buchbinder, Elizabeth I., y Anupam Desai. 2016. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology* 39 (1): 98–106. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>.
19. Burstein, Harold J., Sarah Temin, Holly Anderson, Thomas A. Buchholz, Nancy E. Davidson, Karen E. Gelmon, Sharon H. Giordano, et al. 2014. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor–positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology* 32 (21): 2255–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.2258>.
20. Calzascia, Thomas, Marc Pellegrini, Håkan Hall, Laurent Sabbagh, Nobuyuki Ono, Alisha R. Elford, Tak W. Mak, y Pamela S. Ohashi. 2007. TNF- $\alpha$  is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, noviembre, JCI32567. <https://doi.org/10.1172/JCI32567>.
21. Cardoso, F., J.M.S. Bartlett, L. Slaets, C.H.M. van Deurzen, E. van Leeuwen-Stok, P. Porter, B. Linderholm, et al. 2018. Characterization of male breast cancer: results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Annals of Oncology* 29 (2): 405–17. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx651>.
22. Casey, Stephanie C., Amedeo Amedei, Katia Aquilano, Asfar S. Azmi, Fabian Benencia, Dipita Bhakta, Alan E. Bilsland, et al. 2015. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* 35 (diciembre): S199–223. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.007>.

23. Castrejón Vázquez, Maria Isabel, Aldo Arturo Reséndiz-Albor, Mario A. Ynga-Durand, Ivonne Maciel Arciniega Martínez, Vanessa Ivonne Orellana-Villazon, Carlos Alberto García López, Maria Laura Laue Noguera, y Maria Eugenia Vargas Camaño. 2019. Dialyzable leukocyte extract (Transferon™) administration in sepsis: experience from a single referral pediatric intensive care unit. *BioMed Research International* 2019 (junio): 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/8980506>.
24. Caulfield, Sarah E., Christine C. Davis, y Kristina F. Byers. 2019. Olaparib: a novel therapy for metastatic breast cancer in patients with a BRCA1/2 mutation. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 10 (2): 167–74.
25. Cesta, Mark F. 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34 (5): 455–65. <https://doi.org/10.1080/01926230600867743>.
26. Choudhury, Hira, Manisha Pandey, Bapi Gorain, Bappaditya Chatterjee, Thiagarajan Madheswaran, Shadab Md, K.-K. Mak, Murtaza Tambuwala, Manish K. Chourasia, y Prashant Kesharwani. 2019. Nanoemulsions as effective carriers for the treatment of lung cancer. En *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*, 217–47. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815720-6.00009-5>.
27. Coleman, William B., y Gregory J. Tsongalis. 2002. The role of genomic instability in the development of human cancer. En *The Molecular Basis of Human Cancer*, editado por William B. Coleman y Gregory J. Tsongalis, 115–42. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-125-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-125-1_6).
28. Coronado-Cerda, Erika Evangelina, Moisés Armides Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Heriberto Prado-García, Lydia Guadalupe Rivera-Morales, Pablo Zapata-Benavides, María del Carmen Rodríguez-Salazar, Diana Caballero-Hernandez, Reyes Silvestre Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2016. *In vivo* chemoprotective activity of bovine dialyzable leukocyte extract in mouse bone marrow cells against damage induced by 5-Fluorouracil”. *Journal of Immunology Research* 2016: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/6942321>.
29. Demečková, Vlasta, Peter Solár, Gabriela Hřčková, Dagmar Mudroňová, Bianka Bojková, Monika Kassayová, y Soňa Gancarčíková. 2017. Immodin and its immune system supportive role in paclitaxel therapy of 4T1 mouse breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89 (mayo): 245–56. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.034>.
30. DeSantis, Carol E., Stacey A. Fedewa, Ann Goding Sauer, Joan L. Kramer, Robert A. Smith, y Ahmedin Jemal. 2016. Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women: breast cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66 (1): 31–42. <https://doi.org/10.3322/caac.21320>.
31. DeSantis, Carol E., Jiemin Ma, Ann Goding Sauer, Lisa A. Newman, y Ahmedin Jemal. 2017. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state: breast cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (6): 439–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21412>.
32. Diaz-Montero, C. Marcela, Mohamed Labib Salem, Michael I. Nishimura, Elizabeth Garrett-Mayer, David J. Cole, y Alberto J. Montero. 2009. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage,

- metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (1): 49–59. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0523-4>.
33. Ehemann, C. R., K. M. Shaw, A. B. Ryerson, J. W. Miller, U. A. Ajani, y M. C. White. 2009. The changing incidence of *in situ* and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999–2004. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18 (6): 1763–69. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-1082>.
  34. Emens, Leisha A., y Gary Middleton. 2015. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunology Research* 3 (5): 436–43. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0064>.
  35. Esteve, Francisco J, Vanessa M Hubbard-Lucey, Jun Tang, y Lajos Pusztai. 2019. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *The Lancet Oncology* 20 (3): e175–86. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30026-9).
  36. Exman, Pedro, Romualdo Barroso-Sousa, y Sara M Tolaney. 2019. Evidence to date: Talazoparib in the treatment of breast cancer. *OncoTargets and Therapy* Volume 12 (julio): 5177–87. <https://doi.org/10.2147/OTT.S184971>.
  37. Farhood, Bagher, Masoud Najafi, y Keywan Mortezaee. 2019. “CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review. *Journal of Cellular Physiology* 234 (6): 8509–21. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>.
  38. Fisher, Daniel T., Michelle M. Appenheimer, y Sharon S. Evans. 2014. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology* 26 (1): 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>.
  39. Flores-Luna, Lourdes, Eduardo Salazar-Martínez, Reyna Margarita Duarte-Torres, Gabriela Torres-Mejía, Patricia Alonso-Ruiz, y Eduardo Lazcano-Ponce. 2008. Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama. *Salud Pública de México* 50 (2): 119–25. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342008000200005>.
  40. Folkman, Judah. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of Surgery* 175 (3): 409–16. <https://doi.org/10.1097/00000658-197203000-00014>.
  41. Folkman, Judah. 1974. Proceedings: tumor angiogenesis factor. *Cancer Research* 34 (8): 2109–13.
  42. Fragomeni, Simona Maria, Andrew Sciallis, y Jacqueline S. Jeruss. 2018. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 27 (1): 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>.
  43. Franco-Molina, M.A., E. Mendoza-Gamboa, D. Miranda-Hernández, P. Zapata-Benavides, L. Castillo-León, C. Isaza-Brando, R.S. Tamez-Guerra, y C. Rodríguez-Padilla. 2006. *In vitro* effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 8 (4): 408–14. <https://doi.org/10.1080/14653240600847266>.
  44. Franco-Molina, M.A., E. Mendoza-Gamboa, P. Zapata-Benavides, M.E. Vera-García, P. Castillo-Tello, A. García de la Fuente, R.D. Mendoza, R.G. Garza, R.S. Támez-Guerra, y C. Rodríguez-Padilla. 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-

- small cell lung cancer patients. *Cytotherapy* 10 (5): 490–96. <https://doi.org/10.1080/14653240802165681>.
45. Franco-Molina, Moisés A. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research* 5 (22). <https://doi.org/10.5897/AJMR11.578>.
  46. Franco-Molina, Moisés A., Edgar Mendoza-Gamboa, Leonardo Castillo-León, Reyes S. Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2005. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in Lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Journal of Medicinal Food* 8 (1): 20–26. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.20>.
  47. Franco-Molina, Moises A., Edgar Mendoza-Gamboa, Erika E. Coronado-Cerda, Diana Zarate-Triviño, Juan E. Arizpe-Coronado, Pablo Zapata-Benavides, Yareellys Ramos Zayas, Reyes Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2017. Clinical trial evaluating the effectiveness of biocompound IMMUNEPOTENT CRP in the third-molar extraction. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31 (1): 182–86. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1249408>.
  48. Franco-Molina, Moisés A., Edgar Mendoza-Gamboa, Pablo Zapata-Benavides, Paloma Castillo-Tello, Clara E. Isaza-Brando, Diana Zamora-Avila, Lydia G. Rivera-Morales, et al. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32 (4): 637–46. <https://doi.org/10.3109/08923971003663253>.
  49. Franco-Molina, Moises A., Silvia E. Santana-Krímskaya, Erika E. Coronado-Cerda, Carlos Eduardo Hernández-Luna, Diana G. Zarate-Triviño, Pablo Zapata-Benavides, Edgar Mendoza-Gamboa, María C. Rodríguez-Salazar, Reyes Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2018. Increase of the antitumour efficacy of the biocompound IMMUNEPOTENT CRP by enzymatic treatment. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32 (4): 1028–35. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1460622>.
  50. Franco-Molina, Moisés Armides, Silvia Elena Santana Krímskaya, Reyes Tamez Guerra, y Cristina Rodríguez Padilla. 2019. A review of IMMUNEPOTENT CRP, a modifier of biological response: efficacy and current practice. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research* 14 (1): 10477–80. <https://doi.org/10.26717.BJSTR.2019.14.002509>.
  51. Frasca, Loredana, Maria Nasso, Fabiana Spensieri, Giorgio Fedele, Raffaella Palazzo, Fabio Malavasi, y Clara Maria Ausiello. 2008. IFN- $\gamma$  arms human dendritic cells to perform multiple effector functions. *The Journal of Immunology* 180 (3): 1471–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1471>.
  52. Gajewski, Thomas F, Hans Schreiber, y Yang-Xin Fu. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14 (10): 1014–22. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>.
  53. Ghiringhelli, François, Cedric Menard, Pierre Emmanuel Puig, Sylvain Ladoire, Stephan Roux, François Martin, Eric Solary, Axel Le Cesne, Laurence Zitvogel, y Bruno Chauffert. 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions

- in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56 (5): 641–48. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8>.
54. Ginsburg, Ophira, Freddie Bray, Michel P Coleman, Verna Vanderpuye, Alexandru Eniu, S Rani Kotha, Malabika Sarker, et al. 2017. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet* 389 (10071): 847–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31392-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31392-7).
  55. Gómez-Dantés, Héctor, Héctor Lamadrid-Figueroa, Lucero Cahuana-Hurtado, Omar Silverman-Retana, Pablo Montero, María Cecilia González-Robledo, Christina Fitzmaurice, et al. 2016. The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Pública de México* 58 (2): 118–31.
  56. Gruosso, Tina, Mathieu Gigoux, Venkata Satya Kumar Manem, Nicholas Bertos, Dongmei Zuo, Irina Perlitch, Sadiq Mehdi Ismail Saleh, et al. 2019. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *Journal of Clinical Investigation* 129 (4): 1785–1800. <https://doi.org/10.1172/JCI96313>.
  57. Guerin, Marion V, Veronica Finisguerra, Benoit J Van den Eynde, Nadege Bercovici, y Alain Trautmann. 2020. Preclinical murine tumor models: a structural and functional perspective. *ELife* 9 (enero): e50740. <https://doi.org/10.7554/eLife.50740>.
  58. Hanahan, Douglas, y Robert A Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
  59. Hanahan, Douglas, y Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”. *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
  60. Harbeck, Nadia, Frédérique Penault-Llorca, Javier Cortes, Michael Gnant, Nehmat Houssami, Philip Poortmans, Kathryn Ruddy, Janice Tsang, y Fatima Cardoso. 2019. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 5 (1): 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
  61. Hasan, Mostafa, İ. Esra Büyüктаhtakın, y Elshami Elamin. 2019. A multi-criteria ranking algorithm (MCRA) for determining breast cancer therapy. *Omega* 82 (enero): 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.omega.2017.12.005>.
  62. Hellström, Karl Erik, y Ingegerd Hellström. 1981. *In situ* expression of tumor immunity. Contemporary Topics in Immunobiology, Vol. 10.” *Cell* 23 (2): 635–36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90160-4).
  63. Hervas-Stubbs, S., J. L. Perez-Gracia, A. Rouzaut, M. F. Sanmamed, A. Le Bon, y I. Melero. 2011. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical Cancer Research* 17 (9): 2619–27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1114>.
  64. Hirata, Eishu, y Erik Sahai. 2017. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (7): a026781. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026781>.
  65. Hotblack, Alastair, Angelika Holler, Alice Piapi, Sophie Ward, Hans J. Stauss, y Clare L. Bennett. 2018. Tumor-resident dendritic cells and macrophages modulate the accumulation of TCR-engineered T cells in melanoma. *Molecular Therapy* 26 (6): 1471–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.011>.
  66. Hwang, Soo-Yeon, Seojeong Park, y Youngjoo Kwon. 2019. Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacology &*

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.006>.

67. Ignacio Tapia-Salas, Daniel Motola-Kuba, Fredy Chable-Montero, Gabriela Alvarado-Luna, y Óscar Arrieta-Rodríguez. 2016. Poor survival in triple negative breast cancer. *Revista de Investigación Médica Sur México* 23 (1): 34–37.
68. Jahanzeb, Mohammad. 2008. Adjuvant Trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clinical Breast Cancer* 8 (4): 324–33. <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.037>.
69. Kang, Connie, y Yahiya Y. Syed. 2020. Atezolizumab (in combination with Nab-Paclitaxel): a review in advanced triple-negative breast cancer. *Drugs* 80 (6): 601–7. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01295-y>.
70. Khosravi-Shahi, Parham, Luis Cabezón-Gutiérrez, y Maria Inmaculada Aparicio Salcedo. 2019. “State of Art of Advanced Triple Negative Breast Cancer”. *The Breast Journal* 25 (5): 967–70. <https://doi.org/10.1111/tbj.13369>.
71. King, Alice, Swathi Balaji, Louis D. Le, Timothy M. Crombleholme, y Sundeeep G. Keswani. 2014. Regenerative wound healing: the role of interleukin-10. *Advances in Wound Care* 3 (4): 315–23. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0461>.
72. Kirkpatrick, C. H. 2000. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Molecular Medicine* 6 (4): 332–41.
73. Kitagishi, Yasuko, Mayumi Kobayashi, y Satoru Matsuda. 2013. Defective DNA repair systems and the development of breast and prostate cancer. *International Journal of Oncology* 42 (1): 29–34. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1696>.
74. Kohler, Betsy A., Recinda L. Sherman, Nadia Howlader, Ahmedin Jemal, A. Blythe Ryerson, Kevin A. Henry, Francis P. Boscoe, et al. 2015. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 107 (6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv048>.
75. Kumar, Vinit, Sima Patel, Evgenii Tcyganov, y Dmitry I. Gabrilovich. 2016. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology* 37 (3): 208–20. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>.
76. Lara, Humberto H., Liliana Ixtepan Turrent, Elsa N. Garza-Treviño, Reyes Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2010. Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1 (3): 425–31. [https://doi.org/10.3892/etm\\_00000066](https://doi.org/10.3892/etm_00000066).
77. Lara-Medina, Fernando, Víctor Pérez-Sánchez, David Saavedra-Pérez, Monika Blake-Cerda, Claudia Arce, Daniel Motola-Kuba, Cynthia Villarreal-Garza, et al. 2011. Triple-Negative breast cancer in hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer* 117 (16): 3658–69. <https://doi.org/10.1002/cncr.25961>.
78. Lei, Xu, Yu Lei, Jin-Ke Li, Wei-Xing Du, Ru-Gui Li, Jing Yang, Jian Li, Fang Li, y Hua-Bing Tan. 2020. Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Letters* 470 (febrero): 126–33. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>.
79. Li, Jun-Yan, Yu-Pei Chen, Ying-Qin Li, Na Liu, y Jun Ma. 2021. Chemotherapeutic and targeted agents can modulate the tumor microenvironment

- and increase the efficacy of immune checkpoint blockades. *Molecular Cancer* 20 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01317-7>.
80. Li, Yang, Wei Wang, Fan Yang, Yanan Xu, Chang Feng, y Yong Zhao. 2019. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Communication and Signaling* 17 (1): 147. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0471-y>.
  81. Li, Zehuan, Yiran Qiu, Weiqi Lu, Ying Jiang, y Jin Wang. 2018. Immunotherapeutic interventions of triple negative breast cancer. *Journal of Translational Medicine* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1514-7>.
  82. Lindau, Dennis, Paul Gielen, Michiel Kroesen, Pieter Wesseling, y Gosse J. Adema. 2013. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and Natural Killer T cells. *Immunology* 138 (2): 105–15. <https://doi.org/10.1111/imm.12036>.
  83. List, Markus, Nicolas Alcaraz, y Richa Batra. 2020. *De novo* pathway-based classification of breast cancer subtypes. En *Protein-Protein Interaction Networks*, editado por Stefan Canzar y Francisca Rojas Ringeling, 2074:201–13. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9873-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9873-9_15).
  84. Liu, Min, Xing Jin, Xigan He, Ling Pan, Xiumei Zhang, y Yunxue Zhao. 2015. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. Editado por Pranela Rameshwar. *PLOS ONE* 10 (3): e0121921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121921>.
  85. Liu, Yu, Yinyan Yu, Suguang Yang, Bin Zeng, Zhuohan Zhang, Guohui Jiao, Yuan Zhang, Limin Cai, y Rongcun Yang. 2009. Regulation of arginase I activity and expression by both PD-1 and CTLA-4 on the myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (5): 687–97. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0591-5>.
  86. Mao, Yan, Evan T. Keller, David H. Garfield, Kunwei Shen, y Jianhua Wang. 2013. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 32 (1–2): 303–15. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3>.
  87. Murata, Kenji, Tomohide Tsukahara, y Toshihiko Torigoe. 2016. Cancer immunotherapy and immunological memory. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 39 (1): 18–22. <https://doi.org/10.2177/jsci.39.18>.
  88. Niederhuber, John E. 2019. *Abeloff's clinical oncology*. 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier.
  89. Nik-Zainal, Serena, Helen Davies, Johan Staaf, Manasa Ramakrishna, Dominik Glodzik, Xueqing Zou, Inigo Martincorena, et al. 2016. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 534 (7605): 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>.
  90. Nishio, H, T Yaguchi, J Sugiyama, H Sumimoto, K Umezawa, T Iwata, N Susumu, et al. 2014. Immunosuppression through constitutively activated NF- $\kappa$ B signalling in human ovarian cancer and its reversal by an NF- $\kappa$ B inhibitor”. *British Journal of Cancer* 110 (12): 2965–74. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.251>.
  91. Nouroz, Faisal, Farzana Bibi, Shumaila Noreen, y Nosheen Masood. 2016. Natural killer cells enhance the immune surveillance of cancer. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 17 (2): 149–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.08.006>.

92. Nowak, Anna K., Bruce W. S. Robinson, y Richard A. Lake. 2003. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Research* 63 (15): 4490–96.
93. Ohue, Yoshihiro, y Hiroyoshi Nishikawa. 2019. Regulatory T (Treg) cells in cancer: can treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science* 110 (7): 2080–89. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>.
94. Osipov, Arsen, Adrian Murphy, y Lei Zheng. 2019. From immune checkpoints to vaccines: the past, present and future of cancer immunotherapy. *Advances in Cancer Research*, 143:63–144. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.002>.
95. Paget, Stephen. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133 (3421): 571–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).
96. Paluskievicz, Christina M., Xuefang Cao, Reza Abdi, Pan Zheng, Yang Liu, y Jonathan S. Bromberg. 2019. T regulatory cells and priming the suppressive tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology* 10 (octubre): 2453. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02453>.
97. Plava, Jana, Marina Cihova, Monika Burikova, Miroslava Matuskova, Lucia Kucerova, y Svetlana Miklikova. 2019. Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer. *Molecular Cancer* 18 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0960-z>.
98. Qu, Xinglong, Ying Tang, y Shucheng Hua. 2018. Immunological approaches towards cancer and inflammation: a cross talk. *Frontiers in Immunology* 9 (marzo): 563. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00563>.
99. Rodríguez-Salazar, Maria del Carmen, Moises Armides Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Ana Carolina Martínez-Torres, Pablo Zapata-Benavides, Jose Sullivan López-González, Erika Evangelina Coronado-Cerda, Juan Manuel Alcocer-González, Reyes Silvestre Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology Letters* 14 (1): 844–52. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6202>.
100. Roma-Rodrigues, Catarina, Rita Mendes, Pedro Baptista, y Alexandra Fernandes. 2019. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): 840. <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>.
101. Selye, H. 1953. Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Experimental Biology and Medicine* 82 (2): 328–33. <https://doi.org/10.3181/00379727-82-20108>.
102. Sherwood, Louis M., Edith E. Parris, y Judah Folkman. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285 (21): 1182–86. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>.
103. Shoaib, Maria, y Syed Ahsanuddin Ahmed. 2016. Role of natural herbs and phytochemicals to minimize tumor and economic burden in breast cancer treatment. *Breast Cancer: Targets and Therapy* Volume 8 (12): 241–42. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S125826>.



104. Sierra-Rivera, Crystel A., Moisés A. Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Pablo Zapata-Benavides, Jesús Santaolalla-Tapia, Erika E. Coronado-Cerda, Reyes S. Tamez-Guerra, y Cristina Rodríguez-Padilla. 2016. "Effect of bovine dialyzable leukocyte extract on induction of cell differentiation and death in K562 human chronic myelogenous leukemia cells". *Oncology Letters* 12 (6): 4449–60. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5285>.
105. Solár, Peter, Veronika Sačková, Gabriela Hřčková, Vlasta Demečková, Monika Kassayová, Bianka Bojková, Dagmar Mudroňová, Soňa Gancarčíková, Rastislav Jendželovský, y Peter Fedoročko. 2017. "Antitumor effect of the combination of manumycin A and Immodin is associated with antiplatelet activity and increased granulocyte tumor infiltration in a 4T1 breast tumor model". *Oncology Reports* 37 (1): 368–78. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5265>.
106. Stone, Jill P., Rebecca L. Hartley, y Claire Temple-Oberle. 2018. Breast cancer in transgender patients: a systematic review. part 2: female to male. *European Journal of Surgical Oncology* 44 (10): 1463–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.06.021>.
107. Thiyagarajan, Dhanalakshmi K., Hajira Basit, y Rebecca Jeanmonod. 2020. Physiology, menstrual cycle. En *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/>.
108. Ting Bao y Michelle A Rudek. 2011. The clinical pharmacology of Anastrozole. *European Oncology & Haematology* 07 (02): 106. <https://doi.org/10.17925/EOH.2011.07.02.106>.
109. Torre, L. A., R. L. Siegel, E. M. Ward, y A. Jemal. 2016. Global cancer incidence and mortality rates and trends - an update". *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 25 (1): 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>.
110. Trinchieri, Giorgio. 2007. Interleukin-10 Production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (2): 239–43. <https://doi.org/10.1084/jem.20070104>.
111. Trujillo-de Santiago, Grissel, Brenda Giselle Flores-Garza, Jorge Alfonso Tavares-Negrete, Itzel Montserrat Lara-Mayorga, Ivonne González-Gamboa, Yu Shrike Zhang, Augusto Rojas-Martínez, Rocío Ortiz-López, y Mario Moisés Álvarez. 2019. The tumor-on-chip: recent advances in the development of microfluidic systems to recapitulate the physiology of solid tumors. *Materials* 12 (18): 2945. <https://doi.org/10.3390/ma12182945>.
112. Umezawa, Kazuo. 2012. Involvement of NF- $\kappa$ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- $\alpha$ -induced breast cancer cell adhesion". *Oncology Reports*, marzo. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1733>.
113. Valkenburg, Kenneth C., Amber E. de Groot, y Kenneth J. Pienta. 2018. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15 (6): 366–81. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0007-1>.
114. Vega, Horacio Astudillo-de la, Érika Ruiz-García, David Muñoz-González, Javier Barajas-Figueroa, Jesús Miguel Lázaro-León, Héctor A. Maldonado-Martínez, y Vicente Valero. 2014. Biomarcadores del cáncer de mama vs firmas genómicas: hacia la búsqueda de una terapia personalizada. *Revista Mexicana de Mastología* 4 (1): 9–17.

115. Voelker, Rebecca. 2020. Triple-negative breast cancer drug receives approval. *JAMA* 323 (21): 2122. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8312>.
116. Wan, L., C. A. Neumann, y P. R. LeDuc. 2020. Tumor-on-a-chip for integrating a 3D tumor microenvironment: chemical and mechanical factors. *Lab on a Chip* 20 (5): 873–88. <https://doi.org/10.1039/C9LC00550A>.
117. Wang, Fang-Tao, Wei Sun, Jing-Tao Zhang, y Yue-Zu Fan. 2019. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer (Review). *Oncology Letters*, enero. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9973>.
118. White, Michael J. V., David Roife, y Richard H. Gomer. 2015. Galectin-3 binding protein secreted by breast cancer cells inhibits monocyte-derived fibrocyte differentiation. *The Journal of Immunology* 195 (4): 1858–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500365>.
119. Witz, Isaac P. 2009. The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenvironment* 2 (S1): 9–17. <https://doi.org/10.1007/s12307-009-0025-8>.
120. Yang, Mei, y Xijie Yu. 2020. Management of bone metastasis with intravenous bisphosphonates in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of dosing frequency. *Supportive Care in Cancer* 28 (6): 2533–40. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05355-7>.
121. Zarrouki, B, N J Pillon, E Kalbacher, H A Soula, G Nia N’Jomen, L Grand, S Chambert, A Geloën, y C O Soulage. 2010. Cirsimarín, a potent antilipogenic flavonoid, decreases fat deposition in mice intra-abdominal adipose tissue. *International Journal of Obesity* 34 (11): 1566–75. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.85>.
122. Zhang, Qing, Jiacheng Bi, Xiaodong Zheng, Yongyan Chen, Hua Wang, Wenyong Wu, Zhengguang Wang, et al. 2018. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nature Immunology* 19 (7): 723–32. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0132-0>.

## **12. Resumen biográfico**

Silvia Elena Santana Krímskaya

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DE LA TERAPIA BASADA EN DOXORRUBICINA/CICLOFOSFAMIDA MÁS IMMUNEPOTENT CRP SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Campo de Estudios: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Crimea, Rusia el 24 de diciembre de 1989, de nacionalidad nicaragüense, hija de Leonel Santana Vega y Liudmila B. Krímskaya.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nicaragua, León grado obtenido Bioanalista Clínico en el año 2011. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Mastro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en 2017.

Experiencia Profesional: Bioanalista Clínico en el Hospital Infantil de Referencia Nacional Manuel de Jesús Rivera 2011-2012, Bioanalista Clínico en Laboratorio de Bioanálisis Clínico 2013-2014.